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

(21) BR 112020020868-0 A2

(22) Data do Depósito: 12/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(54) Título: ANTICORPOS DE GALECTINA-10

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 11/00; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2019 GB 1901648.4; 13/04/2018 GB 1806099.6.

(71) Depositante(es): ARGENX BVBA; VIB VZW; UNIVERSITEIT GENT.

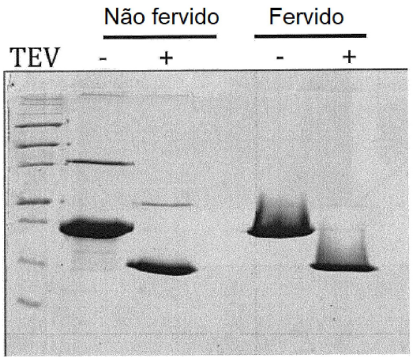
(72) Inventor(es): BART LAMBRECHT; SAVVAS SAVVIDES; HAMIDA HAMMAD; KENNETH VERSTRAETE; JEAN-MICHEL PERCIER; CHRISTOPHE BLANCHETOT; MICHAEL SAUNDERS; HANS DE HAARD; BAS VAN DER WONING; EMMA PERSSON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019059570 de 12/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/197675 de 17/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 09/10/2020

(57) Resumo: ANTICORPOS DE GALECTINA10". A presente invenção se refere a antagonistas, particularmente anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que se ligam à proteína galectina-10, particularmente galectina-10 humana. Os antagonistas da galectina-10 interrompem a cristalização da galectina-10 e são, portanto, úteis em métodos de prevenção e tratamento de doenças e condições em que a patologia está ligada à formação/presença de cristais de Charcot-Leyden (CLCs).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS DE GALECTINA-10"**

Campo da Invenção

[001] A presente invenção se refere a antagonistas, particularmente anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que se ligam à proteína galectina-10, particularmente galectina-10 humana. Os antagonistas da galectina-10, particularmente os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da invenção, interrompem a cristalização da galectina-10 e são, portanto, úteis em métodos de prevenção e tratamento de doenças e condições em que a patologia está ligada à formação/presença de Cristais de Charcot-Leyden (CLCs).

Fundamentos da Invenção

[002] Os cristais de Charcot-Leyden (CLCs) foram descritos pela primeira vez em 1853 e são cristais microscópicos e incolores encontrados em pacientes com certas condições, incluindo asma alérgica e infecções parasitárias. CLCs são frequentemente observados em tecidos humanos e secreções associadas a uma resposta inflamatória eosinofílica. Além da asma e infecções parasitárias, esses cristais foram encontrados em pacientes com câncer, por exemplo, leucemia mieloide. Estruturalmente, os CLCs se acumulam como cristais bipiramidais hexagonais extracelulares com um comprimento de 20 a 40 µm e uma largura

de 2 a 4 µm. A proteína que forma esses cristais foi identificada como galectina-10.

[003] Galectina-10 (também conhecida como proteína de cristal de Charcot Leyden) é uma pequena (16,5 kDa) proteína hidrofóbica de ligação ao glicano expressa abundantemente na medula óssea, principalmente por eosinófilos (Chua et al. (2012) *PLoS One*. 7(8): e42549). Galectina-10 também é produzida em menor extensão por basófilos e Tregs Foxp3-positivos (Kubach et al. (2007) *Blood* 110(5): 1550-8). Essa proteína está entre os mais abundantes dos constituintes dos eosinófilos, representando 7% a 10% do total da proteína celular. A galectina-10 é encontrada apenas em seres humanos, carece de um sinal de peptídeo de secreção e domínio transmembrana, e é secretada sob certas condições por mecanismos apócrinos não clássicos e novos.

[004] Apesar de abundantes relatos mostrando o aparecimento de CLCs em tecidos de pacientes com distúrbios eosinofílicos, a visão comum é que esses cristais são meramente um marcador da morte de eosinófilos.

Sumário da invenção

[005] A função *in vivo* da galectina-10 e o significado da formação de CLC permaneceram indescritíveis, particularmente porque os camundongos não carregam um gene LGALS10 que codifica a galectina-10. É relatado aqui como os cristais de galectina-10 podem induzir uma resposta pró-

inflamatória *in vivo* e como essa resposta pode ser suprimida pela administração de anticorpos de galectina-10 com capacidade de interromper a cristalização de galectina-10. É relatado aqui como os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno, incluindo IgGs, anticorpos VHH e Fabs, podem prevenir a cristalização de galectina-10 e também dissolver cristais de galectina-10 pré-existentes. É importante ressaltar que os anticorpos de galectina-10 tiveram a capacidade de dissolver CLCs de amostras de muco de pacientes. Tomados em conjunto, isso demonstra como os agentes que têm como alvo a cristalização da galectina-10 podem ser usados para tratar condições e distúrbios em que a patologia está ligada à presença de CLCs.

[006] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um antagonista que se liga a galectina-10, em que o antagonista se liga a um epítopo de galectina-10 e, assim, protege uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10. O antagonista liga-se preferencialmente à galectina-10 humana. A presente invenção fornece ainda um antagonista que se liga à galectina-10, que, quando ligado à galectina-10 solúvel, inibe a cristalização da galectina-10. A presente invenção fornece ainda um antagonista que se liga à galectina-10, que, quando ligado à galectina-10 cristalina, promove a dissolução da galectina-10 cristalina.

[007] Em certas modalidades, os antagonistas que se

ligam à galectina-10 e, assim, protegem uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10 inibem a cristalização da galectina-10 quando ligada à galectina-10 solúvel. Alternativa ou adicionalmente, os antagonistas da galectina-10, quando ligados à galectina-10 cristalina, podem promover a dissolução da galectina-10 cristalina.

[008] Os antagonistas da presente invenção ligam-se preferencialmente à galectina-10 humana. Em certas modalidades, o antagonista se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10, de preferência galectina-10 humana. O dito epítopo pode compreender um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141. Os resíduos de aminoácidos ou posições de galectina-10 são definidos com referência à sequência de proteína humana aqui identificada como SEQ ID NO: 141.

[009] Em certas modalidades, o antagonista se liga a

um epítopo que compreende Tyr69 ou um epítopo que compreende um aminoácido adjacente a Tyr69. Em modalidades preferenciais, o antagonista se liga a um epítopo que compreende Tyr69. Em outra modalidade preferencial, o antagonista se liga a um epítopo que compreende Glu68, Tyr69 e Gly70, em que as posições de aminoácidos são identificadas com referência à SEQ ID NO: 141. Em certas modalidades, o antagonista se liga a um epítopo que compreende os aminoácidos Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117 e Ala120. Em certas modalidades, o antagonista se liga a

[0010] um epítopo que compreende os aminoácidos Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117, GLu119, Ala120 e Lys122. O epítopo pode compreender adicionalmente Gln74 e/ou Asp98. Em certas modalidades, o antagonista se liga a um epítopo que compreende Glu33, Gly59, Arg60 e Lys79. O epítopo pode compreender adicionalmente Gln74, Gln75 e Glu77. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Leu31, Glu33, Gly59, Arg60, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 e Gln84. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 e Ser109. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Trp72, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Lys79,

Asn80, Met81, Pro82, Gln84 e Ser109. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Phe83, Gln84. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Thr42, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119 e Ala120. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Glu43, Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Lys117, Glu119 e Ala120. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Gln74, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Ile116 e Lys117. Em certas modalidades, o epítopo compreende ou consiste em Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 e Phe135. As posições de aminoácidos de galectina-10 são definidas com referência à sequência de proteína humana aqui identificada como SEQ ID NO: 141.

[0011] O antagonista de galectina-10 pode se ligar a um epítopo que consiste em aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal da galectina-10. Em tais modalidades, o epítopo pode consistir em um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71,

Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141. As posições de aminoácidos de galectina-10 são definidas com referência à sequência de proteína humana aqui identificada como SEQ ID NO: 141.

[0012] Alternativa ou adicionalmente, o antagonista pode se ligar a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos da interface de dimerização da galectina-10. Em tais modalidades, o antagonista pode se ligar a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 e Asp129.

[0013] Em certas modalidades, o antagonista é uma molécula pequena, um polipeptídeo inibitório ou um mimético de anticorpo. Em modalidades preferenciais, o antagonista é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme definido em outro lugar aqui. O anticorpo pode ser uma imunoglobulina, preferencialmente uma imunoglobulina da classe IgG, mais preferencialmente IgG1. O anticorpo pode ser um anticorpo VHH. O anticorpo ou fragmento de ligação ao

antígeno do mesmo pode ser uma variante humanizada ou germinada de um anticorpo não humano, por exemplo, um anticorpo derivado de camelídeo. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender o domínio CH1, região de dobradiça, domínio CH2 e/ou domínio CH3 de uma IgG humana, de preferência IgG1.

[0014] Em certas modalidades, o fragmento de ligação a antígeno é selecionado do grupo que consiste em: um domínio variável da cadeia leve do anticorpo (VL); um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH); um anticorpo de cadeia simples (scFv); um fragmento F(ab')2; um fragmento Fab; um fragmento Fd; um fragmento Fv; um anticorpo de um braço (monovalente); diacorpos, triacorpos, tetracorpos ou qualquer molécula de ligação ao antígeno formada por combinação, montagem ou conjugação de tais fragmentos de ligação a antígeno. Em modalidades preferidas, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab.

[0015] A presente invenção fornece, em outros aspectos, anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à galectina-10. Esses anticorpos podem ser definidos exclusivamente em relação às suas características estruturais, conforme descrito abaixo. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada (VH) e um domínio variável da cadeia leve (VL), em que os domínios VH

e VL compreendem as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 3; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 2; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 58; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 57; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 56;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 5; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 61; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 60; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 59;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 9; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 8; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 7; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 64; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 62;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 12; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 10; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 15; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 14; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 13; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 70; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 69; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 68;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 18; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 17; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 16; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 72; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 20; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 19; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 75; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 74; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 73;

(viii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 23; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 22; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 21; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(ix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 25; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 24; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 77; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 76;

(x) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 28; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 27; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 26; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 79;

(xi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 31; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 30; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 29; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80;

(xii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 33; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 32; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 84; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 83; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 82;

(xiii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID

NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 35; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 34; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 87; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 86; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 85;

(xiv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 38; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 37; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 88;

(xv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 41; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 40; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 39; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 91; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 90; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 89;

(xvi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 43; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 42; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 92;

(xvii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

44; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xviii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 47; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 46; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 45; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(xix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 50; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 49; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 48; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xx) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 52; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 51; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 98; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80; e

(xxi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 55; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 54; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 53;

LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71.

[0016] Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98%

ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(viii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(x) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos

de SEQ ID NO: 121 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 126 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos

90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xviii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xx) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que

compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(xxi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[0017] Para modalidades em que os domínios dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são definidos por uma identidade de sequência de porcentagem particular para uma sequência de referência, os domínios VH e/ou VL podem reter sequências CDR idênticas àquelas presentes na sequência de referência de modo que a variação esteja presente apenas dentro das regiões-quadro.

[0018] Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada (VH) e um domínio variável da cadeia leve (VL), em que os domínios VH e VL compreendem as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 162; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 161; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 160; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 179; LCDR2 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 178; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 177;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 182; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 168; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 167; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 166; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 185; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 184; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 183;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 171; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 170; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 169; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 187; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 186; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 174; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 173; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 172; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 189; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 188; LCDR1 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 176; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 175; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 192; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 191; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 190; e

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 193; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180.

[0019] Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 195 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 196 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 203 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos

90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 205 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 206 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[0020] Para modalidades em que os domínios dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são definidos por uma identidade de sequência de porcentagem particular para uma sequência de referência, os domínios VH e/ou VL podem reter sequências CDR idênticas àquelas presentes na sequência de referência de modo que a variação esteja presente apenas dentro das regiões-quadro.

[0021] Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo VHH que compreende sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 210; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 209; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 213; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 212;

CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 216; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 215; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 219; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 218; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 222; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 221; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 225; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 224; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 228; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 227; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 231; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 230; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 238; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 237; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 241; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 240; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 239;

(xiii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xiv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 244; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 243; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 242;

(xv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xvi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 247; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 246; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 245; e

(xvii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 249; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 248; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217.

[0022] Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo VHH em que o domínio VHH compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada por qualquer uma das SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259,

260, 261, 262, 263, 264, 265 ou 266, ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[0023] Para modalidades em que os domínios VHH são definidos por uma identidade de sequência de porcentagem particular com uma sequência de referência, o domínio VHH pode reter sequências CDR idênticas àquelas presentes na sequência de referência de modo que a variação esteja presente apenas nas regiões estruturais.

[0024] A invenção fornece ainda um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga ao mesmo epítopo que os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno aqui definidos com referência a SEQ ID NO específicas. Também são fornecidos polinucleotídeos isolados que codificam os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, incluindo polinucleotídeos que codificam os domínios VH e/ou VL dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos. A invenção fornece ainda um vetor de expressão que compreende os polinucleotídeos acima mencionados operacionalmente ligados a sequências regulatórias que permitem a expressão do anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, domínio variável da cadeia pesada ou domínio variável da cadeia leve em uma célula hospedeira ou sistema de expressão livre de células. Também são fornecidas células hospedeiras ou

sistemas de expressão livres de células contendo os vetores de expressão mencionados anteriormente.

[0025] A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que compreende um antagonista de acordo com o primeiro aspecto da invenção, particularmente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, e pelo menos um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[0026] É ainda fornecido um antagonista de acordo com o primeiro aspecto da invenção, particularmente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção para uso como um medicamento.

[0027] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar um indivíduo em necessidade disso, em que o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de acordo com o primeiro aspecto da invenção, particularmente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção. O antagonista, anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno ou composição farmacêutica podem ser administrados para tratar uma doença ou condição associada com a presença ou formação de cristais de galectina-10. Em certas modalidades, a doença ou condição é selecionada dentre:

[0028] asma; rinossinusite crônica; doença celíaca; infecção por helmintos; inflamação eosinofílica gastrointestinal; fibrose cística (CF); aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA); vasculite de Churg-Straus; pneumonia eosinofílica crônica; e leucemia mieloide aguda. Em modalidades preferidas, os antagonistas, anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno ou composições farmacêuticas são administrados para tratar a asma.

[0029] A presente invenção também fornece o uso de um antagonista de acordo com o primeiro aspecto da invenção, particularmente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, para a detecção de galectina-10 em uma amostra obtida de um paciente. O antagonista, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é preferencialmente usado para a detecção de galectina-10 cristalina. A amostra do paciente pode ser uma amostra de escarro.

[0030] A invenção também fornece um kit que compreende um antagonista de galectina-10 de acordo com o primeiro aspecto da invenção, de preferência um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e, opcionalmente, instruções de uso.

Breve descrição dos desenhos

[0031] Figura 1: Produção de cristais Gal10 recombinantes similares a cristais CLC *in vivo*

[0032] Gal10 marcado com His foi expresso em E. coli.

(A) SDS Page de Gal10 marcado com His antes e depois da adição da protease TEV para remover a etiqueta His. (B) Espalhamento de laser multi-ângulo (MALLS) revela uma massa molecular de aprox. 40 kDa, representando uma forma dimérica de Gal10 marcado com His em solução. (C) Após a clivagem pela protease TEV, a solução de proteína cristaliza espontaneamente em cristais em forma de agulha. (D) Desenho original de Charcot (1853) que descreve as várias formas de cristais vistos nas vias aéreas dos asmáticos. (E) Capturas de tela de várias formas de cristais tirados de um lote marcado com fluorescência de cristais Gal10 recombinantes. Todas as formas macroscópicas de cristais originalmente descritas por Charcot e von Leyden são encontradas.

[0033] Figura 2: Isolamento e estrutura cristalina de cristais de CLC crescidos *in vivo* de pacientes com sinusite

[0034] (A) Amostras de muco foram coletadas durante cirurgia de pacientes com rinossinusite crônica e pólipos nasais (CRSwNP). O tecido do pólipo é mostrado aqui. (B) A imunocoloração para Gal10 mostra grandes quantidades de material cristalino na mucina pegajosa alérgica. Muco similar também é encontrado nas vias aéreas de pacientes asmáticos e com ABPA. (C) cristal obtido *ex vivo* montado para estudos de difração de raios-X. (D) Padrão de difração de raios-X de um cristal derivado de paciente. (E) A estrutura cristalina do cristal CLC derivado do paciente

revela uma natureza dimérica. (F) Comparação da estrutura de cristal *ex vivo* obtida com cristais Gal10 produzidos de forma recombinante e cristais CLC recristalizados publicados obtidos a partir de uma linha de células de eosinófilos humanos (AML14.3D10) revela similaridade completa (raiz quadrada média da distância (RMSD) diferença de 0,2 Angstrom), mostrando que os cristais Gal10 recombinantes são biossimilares aos CLCs.

[0035] Figura 3: Criação de muteínas Gal10 resistentes à cristalização por meio de análise detalhada da interface de empacotamento de cristais Gal10

[0036] (A) e (B) são vistas de perto de vários aminoácidos intimamente envolvidos na interface de empacotamento de cristal entre dois dímeros Gal10 adjacentes. Os aminoácidos destacados foram selecionados para uma análise mutacional e criação de muteínas. (C) Experiência de cristalização espontânea da proteína Gal10 de tipo selvagem e muteína após a remoção do marcador de His pela protease TEV. A muteína Tyr69Glu era completamente resistente à autocristalização e foi usada em todo o papel como muteína Gal10 solúvel resistente à cristalização. (D) Estrutura de raios-X da muteína Gal10 Tyr69Glu. Essa estrutura foi usada para modelar o perfil de espalhamento em um experimento de espalhamento de raios-X em solução (SAXS) de muteína Tyr69Glu em solução. (E) Os dados experimentais

do experimento SAXS se sobrepõem aos dados modelados, mostrando essencialmente que a muteína forma um dímero em solução. (F) Sobreposição das estruturas do tipo selvagem com mutante Y69E Gal10 com base nos dados SAXS.

[0037] Figura 4: Inflamação inata das vias aéreas induzida por cristais Gal10

[0038] Camundongos C57Bl/6 foram injetados intratraquealmente com cristais Gal10, Gal10mut solúvel ou com PBS de controle. (a) Número de neutrófilos (painel esquerdo) e monócitos (painel direito) recuperados dos pulmões 6 e 24 horas após o tratamento. (b) Níveis de IL-6 (painel esquerdo) e TNFα (painel direito) no lavado broncoalveolar 6 e 24 horas após o tratamento. (c) Níveis de IL-1β e CCL-2 no pulmão 6 e 24 horas após o tratamento. NS implica um valor de p> 0,12; * implica um valor de p <0,033; ** implica um valor de p <0,002; *** implica um valor de p <0,0002; **** implica um valor de p <0,0001.

[0039] Figura 5: A inflamação inata induzida por cristais Gal10 não depende do inflamassoma NLRP3

[0040] Camundongos deficientes em Nlrp3 (painel esquerdo) e deficientes em Caspase1/11 (painel direito) (camundongos deficientes são referidos como -/-), e seus companheiros de ninhada de tipo selvagem (referidos como +/+) foram injetados intratraquealmente com cristais Gal10 ou com controle PBS. O número de neutrófilos recuperados dos

pulmões digeridos das diferentes cepas de camundongos foi determinado 6 e 24 horas após o tratamento. NS implica um valor de p> 0,12; * implica um valor de p <0,033; ** implica um valor de p <0,002; *** implica um valor de p <0,0002; **** implica um valor de p <0,0001.

[0041] Figura 6: A inflamação inata induzida por cristais Gal10 não depende de TLR4

[0042] Receptor Toll-like 4 (TLR4)-deficiente e seus companheiros de ninhada do tipo selvagem (WT) foram injetados intratraquealmente com cristais Gal10 ou com PBS de controle. O número de neutrófilos recuperados dos pulmões digeridos das diferentes cepas de camundongos foi determinado 24 horas após o tratamento. NS implica um valor de p> 0,12; * implica um valor de p <0,033; ** implica um valor de p <0,002; *** implica um valor de p <0,0002; **** implica um valor de p <0,0001.

[0043] Figura 7: Cristais Gal10 aumentam as características da asma humana em um modelo humanizado da doença

[0044] (A) Configuração experimental que ilustra o regime de dosagem de extratos de ácaros do pó doméstico (HDM) e as diferentes formas de Galectina 10. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram injetadas intraperitonealmente. Extratos de ácaros da poeira doméstica (HDM), cristais de Charcot-Leyden (CLC) e Galectina 10 mutada

(Gal10mut) foram todos administrados por via intratraqueal. (B) Número de leucócitos $CD45^+$ humanos recuperados do pulmão esquerdo de camundongos tratados como descrito em (A). (C) Níveis de IgE humana medidos no soro de camundongos tratados como descrito em (A).

[0045] Figura 8: Prevenção da autocristalização de Gal10 *in vitro* por adição de anticorpos Gal10

[0046] (A) Gal10 foi permitido autocristalizar pela remoção da marca HIS via protease TEV. Esse ensaio foi realizado na presença de vários clones de anticorpos scFv-Fc específicos para Gal10 ou anticorpos scFv-Fc irrelevantes, e a formação de cristais foi observada em um robô de cristalização. (B) visão geral da atividade de vários anticorpos scFv-Fc e IgG1.

[0047] Figura 9: Imagens de lapso de tempo de dissolução de cristal por 4 clones de anticorpos IgG1

[0048] (A) Para estudar se os anticorpos também podem dissolver os cristais existentes, os clones foram adicionados aos cristais Gal10 crescidos *in vitro* e observados com o uso de microscopia confocal de disco giratório. Os 4 clones dissolveram completamente os cristais em 90 minutos, enquanto o anticorpo de isotipo irrelevante não o fez. (B) Curva de dissolução cinética de cristais após adição de anticorpos de dissolução de cristal. A área total de material cristalino refrativo na visão de alta potência

do microscópio de disco giratório foi integrada e normalizada para 1 antes da adição dos cristais.

[0049] Figura 10: Estrutura de cristal de fragmentos Fab de clones de dissolução de cristal em complexo com Gal10

[0050] Cristais de uma mistura de fragmentos Fab e Gal10 recombinante foram formados com o uso de um robô de cristalização, e posteriormente analisados por difração de raios-X (A-C). A estrutura de cristal Gal10 é representada como um modelo de desenho animado (preto). A cadeia leve (LC) e a cadeia pesada (HC) dos fragmentos Fab são mostradas no modo de superfície com o LC colorido em branco e o HC colorido em cinza escuro. (D-F) Os três clones a partir dos quais a estrutura de co-cristalização pode ser obtida têm como alvo o resíduo Tyr69 crucial de Gal10.

[0051] Figura 11: Solubilização de cristais de CLC no muco de pacientes com CRSwNP por anticorpos

[0052] Mucina alérgica pegajosa fresca de pacientes com CRSwNP foi coletada durante a cirurgia sinusal de rotina e armazenada por 2 dias antes da adição de anticorpos de dissolução de cristal ou controle de isotipo. Os cristais podem ser facilmente identificados no muco fresco dos pacientes devido às suas propriedades altamente difrativas em um microscópio confocal de disco giratório. Após a adição de anticorpos que dissolvem o cristal, os cristais se dissolvem durante a noite.

[0053] Figura 12: Prova de conceito de que a solubilização de cristais Gal10 *in vivo* reduz as principais características da asma em um modelo de camundongo humanizado

[0054] (A) Configuração experimental que ilustra o regime de dosagem de extratos de ácaros do pó doméstico (HDM), cristais de Galectina 10 e de anticorpos. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram injetadas intraperitonealmente. Extratos de ácaros da poeira doméstica (HDM), cristais de Galectina 10, anticorpos 1D11 e anticorpos controle foram todos administrados por via intratraqueal. (B) Coloração de hematoxilina eosina de seções de pulmão, (C) Níveis de IgE humana medidos no soro, (D) Expressão de mRNA de Mucina Muc5ac em pulmões de camundongos tratados conforme descrito em (A), (E) Análise de imagem quantitativa cega para o investigador do número de células inflamatórias que se estendem em uma região de perímetro de 500 µm a partir da membrana basal, expresso por comprimento da membrana basal, (F) Broncoconstrição medida como resistência dinâmica das vias aéreas (Rrs) após inalação de concentrações crescentes do broncoconstritor metacolina.

[0055] Figura 13: Seleção de extratos periplasmáticos de scFv por ELISA

[0056] A capacidade de ligação à galectina-10 de extratos periplasmáticos de scFv foi determinada por ELISA de ligação, conforme descrito neste documento. A absorvância

foi medida a 450 nm (referência a 620 nm). Para cada placa mestre periplasmática (PMP), um controle em branco e um controle negativo (ligação do extrato periplasmático ao alvo irrelevante) foram incluídos. Os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Um aglutinante foi definido como um scFv mostrou uma capacidade de ligação superior a 0,5 valor de OD na ligação de ELISA.

[0057] Figura 14: Triagem de extratos periplasmáticos de scFv com o uso de tecnologia BLI

[0058] A capacidade de ligação à galectina-10 de extratos periplasmáticos de scFv selecionados foi analisada na tecnologia BLI com o uso de um Octet Red96. Uma abordagem de captura foi usada, em que galectina-10-His humana e de cinomolgo (isoformas WGS ou REF) foram imobilizados em biossensores anti-His1K antes de serem incubados com extratos periplasmáticos de scFv selecionados diluídos. A taxa de dissociação de cada clone scFv plotada no GraphPad Prism 7.01.

[0059] Figura 15: Dissolução de cristal por anticorpos Gal10 IgG1

[0060] Para estudar se os anticorpos Gal10 podem dissolver os cristais existentes, os clones foram adicionados a cristais Gal10 humanos recombinantes crescidos *in vitro* e observados com o uso de microscopia confocal de disco giratório. Os 8 clones dissolveram completamente os

cristais ao longo do tempo estudado, enquanto o anticorpo de isotipo irrelevante não o fez.

[0061] Figura 16: Estrutura de cristal de fragmentos Fab de clones de dissolução de cristal em complexo com Gal10

[0062] Cristais de uma mistura de fragmentos Fab e Gal10 recombinante foram formados com o uso de um robô de cristalização, e posteriormente analisados por difração de raios-X.

[0063] Figura 17: Dissolução de cristal por anticorpos Gal10 IgG1 e fragmentos Fab

[0064] Experimentos de dissolução de CLC com o uso de CLCs humanos recombinantes pré-formados foram realizados ao longo do tempo na presença de mAbs Gal10 e Fabs Gal10. A dissolução dos cristais foi observada com o uso de microscopia confocal de disco giratório.

[0065] Figura 18: Seleção de extratos periplasmáticos de VHH por ELISA

[0066] A capacidade de ligação à galectina-10 dos extratos periplasmáticos de VHH foi medida por ELISA de ligação como aqui descrito. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm). Para cada placa mestre periplasmática (PMP), um controle em branco e um controle negativo (ligação do extrato periplasmático de VHH ao alvo irrelevante) foram incluídos. Os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01.

[0067] Figura 19: Triagem de extratos periplasmáticos de VHH com o uso de tecnologia BLI

[0068] A capacidade de ligação dos extratos periplasmáticos VHH selecionados foi analisada na tecnologia BLI com o uso de um Octet Red96. Para esse propósito, foi usada uma abordagem de captura, em que galectina-10-His humana e de cinomolgos (isoformas WGS ou YRT) foram imobilizados em biossensores anti-His1K antes de serem incubados com extratos periplasmáticos VHH selecionados diluídos. A taxa de dissociação (1/s) e a resposta (nm) de cada clone de VHH foram plotados no GraphPad Prism 7.01.

[0069] Figura 20: Dissolução de cristal por anticorpos Gal10 VHH

[0070] Os experimentos de dissolução de CLC com o uso de CLCs humanos recombinantes pré-formados foram realizados ao longo do tempo na presença de anticorpos Gal10 VHH. A dissolução dos cristais foi observada com o uso de microscopia confocal de disco giratório.

Descrição detalhada

A. Definições

[0071] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que é comumente entendido por um especialista no assunto da técnica no campo técnico da invenção.

[0072] **"Antagonista"** – Conforme usado neste documento, o termo "antagonista" significa qualquer agente com capacidade de se ligar a galectina-10 e proteger uma interface de empacotamento de cristal. Ao proteger ou "obscurecer" uma interface de empacotamento de cristal, a função do antagonista é interromper a cristalização das moléculas de galectina-10. Os antagonistas de acordo com a presente invenção irão tipicamente se ligar especificamente ou "se ligar especificamente" à galectina-10. O termo "ligar-se especificamente" se refere à capacidade de um antagonista de se ligar preferencialmente ao seu alvo, nesse caso, a galectina-10. Os agentes com capacidade de se ligarem a alvos proteicos, particularmente agentes com capacidade de exibir especificidade de ligação para um determinado alvo proteico, são conhecidos dos especialistas no assunto da técnica. Tais agentes incluem, sem limitação, inibidores de moléculas pequenas, moléculas biológicas incluindo peptídeos inibidores e miméticos de anticorpos, como afficorpos, affilinas, affitinas, adnectinas, atrímeros, evasinas, DARPinas, anticalinas, avímeros, finômeros, versacorpos e duocalinas. Antagonistas preferenciais de acordo com a presente invenção são anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos.

[0073] **"Anticorpo" ou "Imunoglobulina"**- Conforme usado neste documento, o termo "imunoglobulina" inclui um

polipeptídeo que tem uma combinação de duas cadeias pesadas e duas leves, que tem ou não qualquer imunorreatividade específica relevante. “Anticorpos” se referem a tais conjuntos que têm significativa atividade imunorreativa específica conhecida para um antígeno de interesse (aqui galectina-10). O termo “anticorpos de galectina-10” é usado neste documento para se referir a anticorpos que exibem especificidade imunológica para a proteína galectina-10, incluindo galectina-10 humana e, em alguns casos, espécies homólogas da mesma. Anticorpos e imunoglobulinas compreendem cadeias leves e pesadas, com ou sem uma ligação covalente intercadeia entre as mesmas. Estruturas básicas de imunoglobulina em sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas.

[0074] O termo genérico “imunoglobulina” compreende cinco classes distintas de anticorpos que podem ser distinguidas bioquimicamente. Todas as cinco classes de anticorpos estão dentro do escopo da presente invenção. A discussão a seguir será geralmente dirigida à classe IgG de moléculas de imunoglobulina. No que diz respeito a IgG, as imunoglobulinas compreendem duas cadeias polipeptídicas leves idênticas de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, e duas cadeias pesadas idênticas de peso molecular 53.000 a 70.000. As quatro cadeias são unidas por ligações dissulfeto em uma configuração “Y”, em que as cadeias leves

envolvem as cadeias pesadas começando na boca do "Y" e continuando através da região variável.

[0075] As cadeias leves de um anticorpo são classificadas como kappa ou lambda (κ,λ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada a uma cadeia leve kappa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas são covalentemente ligadas entre si, e as porções de "cauda" das duas cadeias pesadas são ligadas entre si por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, B células ou células hospedeiras geneticamente modificadas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos vão de um terminal N nas extremidades bifurcadas da configuração Y para o terminal C na parte inferior de cada cadeia. Os especialistas no assunto da técnica apreciarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou épsilon, (γ, μ, α, δ, ε) com algumas subclasses entre as mesmas (por exemplo, γ1-γ4). É a natureza dessa cadeia que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulina (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., são bem caracterizadas e são conhecidas por conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma dessas classes e isotipos são prontamente discerníveis para os especialistas no

assunto da técnica em vista da presente revelação e, portanto, estão dentro do escopo da presente invenção.

[0076] Conforme indicado acima, a região variável de um anticorpo permite que o anticorpo reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítopos em antígenos. Ou seja, o domínio VL e o domínio VH de um anticorpo se combinam para formar a região variável que define um sítio de ligação ao antígeno tridimensional. Essa estrutura de anticorpo quaternário forma o sítio de ligação ao antígeno presente no final de cada braço do Y. Mais especificamente, o sítio de ligação ao antígeno é definido por três regiões determinantes complementares (CDRs) em cada uma das cadeias VH e VL.

[0077] O termo "anticorpo", como aqui usado, também se destina a abranger "anticorpos VHH" ou "anticorpos apenas de cadeia pesada".

[0078] **"Anticorpos VHH"** – Como aqui usado, o termo "anticorpo VHH" ou "anticorpo apenas de cadeia pesada" se refere a um tipo de anticorpo produzido apenas por espécies da família *Camelidae*, que inclui camelos, lhama, alpaca. Os anticorpos apenas de cadeia pesada ou anticorpos VHH são compostos por duas cadeias pesadas e são desprovidos de cadeias leves. Cada cadeia pesada tem um domínio variável no terminal N, e esses domínios variáveis são referidos como domínios "VHH", a fim de distinguir os mesmos dos domínios variáveis das cadeias pesadas dos anticorpos

heterotetraméricos convencionais, ou seja, os domínios VH, descritos acima.

[0079] **"Galectina-10"** - Como aqui usado, o termo "galectina-10" (ou Gal10 ou Gal-10) se refere à pequena proteína de ligação ao glicano hidrofóbica que se autocristaliza para formar cristais de Charcot-Leyden. A galectina-10 também é conhecida como proteína cristalina Charcot-Leyden (CLCP), lisofosfolipase de eosinófilos e lisolecitina acil-hidrolase. O termo "galectina-10" é amplo o suficiente para cobrir a proteína humana e quaisquer homólogos de espécie. A sequência de aminoácidos da galectina-10 humana de comprimento total é representada por SEQ ID NO: 141 (consulte abaixo). Essa sequência corresponde à sequência depositada no banco de dados UniProt como galectina-10 humana, número de acesso Q05315. Também abrangidas pelo termo "galectina-10" estão as variantes de ocorrência natural da sequência humana, por exemplo, a variante Ala→Val na posição 28.

[0080] SEQ ID NO: 141

```
1       10        20        30        40        50
MSLLPVPYTE AASLSTGSTV TIKGRPLACF LNEPYLQVDF HTEMKEESDI
        60        70        80        90        100
VFHFQVCFGR RVVMNSREYG AWKQQVESKN MPFQDGQEFE LSISVLPDKY
      110       120       130       140
QVMVNGQSSY TFDHRIKPEA VKMVQVWRDI SLTKFNVSYL KR
```

[0081] **"Cristais de galectina-10"** ou **"cristais de Charcot-Leyden"** - os termos "cristais de galectina-10",

"cristais de Charcot-Leyden" e "CLCs" são usados aqui indistintamente para se referir a cristais formados de galectina-10. Os cristais formados pela galectina-10 são tipicamente cristais hexagonais bipiramidais e têm aproximadamente 20 a 40 µm de comprimento e aproximadamente 2 a 4 µm de largura. Esses cristais têm sido associados a distúrbios inflamatórios eosinofílicos.

[0082] "**Interface de empacotamento de cristal**" - uma "interface de empacotamento de cristal" de galectina-10 se refere a um conjunto de aminoácidos formando um patch de superfície em galectina-10 que contata uma ou mais moléculas vizinhas de galectina-10 na rede cristalina. CLCs têm diferentes interfaces de empacotamento de cristal e os aminoácidos que formam essas interfaces de empacotamento de cristal foram caracterizados como: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141, em que as posições são definidas com referência à SEQ ID NO: 141 acima.

[0083] "**Epítopo**" - Como usado aqui, o termo "epítopo" significa a região da proteína galectina-10 à qual o

antagonista se liga. Um antagonista ligará tipicamente ao seu respectivo epítopo de galectina-10 através de um sítio de ligação complementar no antagonista. O epítopo ao qual o antagonista se liga compreenderá tipicamente um ou mais aminoácidos da proteína galectina-10 de comprimento completo. O epítopo pode incluir aminoácidos que são contíguos na proteína galectina-10, isto é, um epítopo linear, ou pode incluir aminoácidos que são não contíguos na proteína galectina-10, isto é, um epítopo conformacional.

[0084] **"Sítio de Ligação"** - Como usado aqui, o termo "sítio de ligação" compreende uma região de um polipeptídeo que é responsável pela ligação seletiva a um antígeno alvo de interesse (por exemplo, galectina-10). Os domínios de ligação compreendem pelo menos um sítio de ligação. Domínios de ligação exemplificadores incluem um domínio variável de anticorpo. As moléculas de anticorpo da invenção podem compreender um único sítio de ligação ou múltiplos (por exemplo, dois, três ou quatro) sítios de ligação.

[0085] **"Derivado de"** - Como usado aqui, o termo "derivado de" uma proteína designada (por exemplo, um anticorpo de camelídeo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) se refere à origem do polipeptídeo ou sequência de aminoácidos. Em uma modalidade, o polipeptídeo ou sequência de aminoácidos que é derivada de um polipeptídeo de partida particular é uma sequência CDR ou sequência relacionada a

isso. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos que é derivada de um polipeptídeo de partida particular não é contígua. Por exemplo, em uma modalidade, um, dois, três, quatro, cinco ou seis CDRs são derivadas de um anticorpo de partida. Em uma modalidade, o polipeptídeo ou sequência de aminoácidos que é derivada de um polipeptídeo de partida particular ou sequência de aminoácidos tem uma sequência de aminoácidos que é essencialmente idêntica à da sequência de partida, ou uma porção da mesma em que a porção consiste em pelo menos 3 a 5 aminoácidos, pelo menos 5 a 10 aminoácidos, pelo menos 10 a 20 aminoácidos, pelo menos 20 a 30 aminoácidos, ou pelo menos 30 a 50 aminoácidos, ou que é de outra forma identificável para uma pessoa com habilidade comum na técnica como tendo sua origem na sequência de partida. Em uma modalidade, uma ou mais sequências de CDR derivadas do anticorpo de partida são alteradas para produzir sequências CDR variantes, por exemplo, variantes de afinidade, em que as sequências de CDR variantes mantêm a atividade de ligação ao antígeno alvo.

[0086] **"Derivado de Camelídeo"** - Em certas modalidades preferenciais, os anticorpos da invenção compreendem sequências de aminoácidos estruturais e/ou sequências de aminoácidos CDR derivadas de um anticorpo convencional de camelídeo ou um anticorpo VHH criado por imunização ativa de um camelídeo. No entanto, os anticorpos da invenção que

compreendem sequências de aminoácidos derivadas de camelídeos podem ser projetados para compreender sequências estruturais e/ou de região constante derivadas de uma sequência de aminoácidos humana (isto é, um anticorpo humano) ou outra espécie de mamífero não camelídeo. Por exemplo, uma região estrutural de primata humano ou não humano, porção de cadeia pesada e/ou porção de dobradiça podem ser incluídas nos anticorpos de galectina-10. Em uma modalidade, um ou mais aminoácidos não camelídeos podem estar presentes na região de estrutura de um anticorpo "derivado de camelídeo", por exemplo, uma sequência de aminoácidos de estrutura de camelídeo pode compreender uma ou mais mutações de aminoácidos em que o resíduo de aminoácido de primata não humano ou humano correspondente está presente. Além disso, os domínios VH e VL derivados de camelídeos, ou variantes humanizadas dos mesmos, podem ser ligados aos domínios constantes de anticorpos humanos para produzir uma molécula quimérica, conforme descrito em outro lugar neste documento.

[0087] **"Substituição conservadora de aminoácidos"** – Uma "substituição conservadora de aminoácidos" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais similares foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais

ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial em um polipeptídeo de imunoglobulina pode ser substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Em outra modalidade, uma cadeia de aminoácidos pode ser substituída por uma cadeia estruturalmente similar que difere na ordem e/ou composição dos membros da família da cadeia lateral.

[0088] **"Porção de cadeia pesada"** - Como usado aqui, o termo "porção de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácidos derivadas dos domínios constantes de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Um polipeptídeo que compreende uma porção de cadeia pesada compreende pelo menos um de: um domínio CH1, um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3 ou uma variante ou fragmento dos mesmos. Em uma modalidade, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode compreender a porção Fc de uma cadeia pesada

de imunoglobulina (por exemplo, uma porção de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3). Em outra modalidade, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode não ter pelo menos uma porção de um domínio constante (por exemplo, todo ou parte de um domínio CH2). Em certas modalidades, pelo menos um, e de preferência todos, os domínios constantes são derivados de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Por exemplo, em uma modalidade preferencial, a porção da cadeia pesada compreende um domínio de dobradiça totalmente humano. Em outras modalidades preferenciais, a porção da cadeia pesada compreende uma porção Fc totalmente humana (por exemplo, dobradiça, sequências de domínio CH2 e CH3 de uma imunoglobulina humana).

[0089] Em certas modalidades, os domínios constantes constituintes da porção da cadeia pesada são de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma porção de cadeia pesada de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH2 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3 ou IgG4. Em outras modalidades, os domínios constantes são domínios quiméricos que compreendem porções de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma dobradiça pode compreender uma primeira porção de uma molécula de IgG1 e uma segunda porção de uma molécula de IgG3 ou IgG4. Conforme estabelecido

acima, será entendido por uma pessoa com habilidade comum na técnica que os domínios constantes da porção da cadeia pesada podem ser modificados de modo que variem na sequência de aminoácidos da molécula de imunoglobulina de ocorrência natural (tipo selvagem). Ou seja, os polipeptídeos da invenção aqui revelados podem compreender alterações ou modificações em um ou mais dos domínios constantes da cadeia pesada (CH1, dobradiça, CH2 ou CH3) e/ou no domínio da região constante da cadeia leve (CL). Modificações exemplificadoras incluem adições, deleções ou substituições de um ou mais aminoácidos em um ou mais domínios.

[0090] **"Quimérica"** - Uma proteína "quimérica" compreende uma primeira sequência de aminoácidos ligada a uma segunda sequência de aminoácidos com a qual não está naturalmente ligada na natureza. As sequências de aminoácidos podem normalmente existir em proteínas separadas que são reunidas no polipeptídeo de fusão ou podem normalmente existir na mesma proteína, mas são colocadas em um novo arranjo no polipeptídeo de fusão. Uma proteína quimérica pode ser criada, por exemplo, por síntese química, ou criando e traduzindo um polinucleotídeo no qual as regiões peptídicas são codificadas na relação desejada. Anticorpos quiméricos exemplificadores da invenção incluem proteínas de fusão que compreendem domínios VH e VL derivados de camelídeos, ou variantes humanizadas dos mesmos, fundidos

aos domínios constantes de um anticorpo humano, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana.

[0091] **"Região variável" ou "domínio variável"** - Os termos "região variável" e "domínio variável" são usados aqui de forma intercambiável e pretendem ter um significado equivalente. O termo "variável" se refere ao fato de que certas porções dos domínios variáveis VH e VL diferem extensivamente na sequência entre os anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno alvo. No entanto, a variabilidade não é uniformemente distribuída pelos domínios variáveis de anticorpos. Está concentrado em três segmentos chamados "alças hipervariáveis" em cada um dos domínios VL e VH que fazem parte do sítio de ligação ao antígeno. A primeira, segunda e terceira alças hipervariáveis do domínio de cadeia leve VLambda são aqui referidas como L1(λ), L2(λ) e L3(λ) e podem ser definidas como compreendendo os resíduos 24-33 (L1(λ), consistindo em 9, 10 ou 11 resíduos de aminoácidos), 49-53 (L2(λ), consistindo em 3 resíduos) e 90-96 (L3(λ), consistindo em 5 resíduos) no domínio VL (Morea *et al.*, Methods 20:267 a 279 (2000)). A primeira, segunda e terceira alças hipervariáveis do domínio de cadeia leve VKappa são aqui referidas como L1(κ), L2(κ) e L3(κ) e podem ser definidas como compreendendo os resíduos 25-33 (L1(κ), consistindo em 6, 7, 8, 11, 12 ou 13 resíduos), 49-53 (L2(κ),

consistindo em 3 resíduos) e 90-97 (L3(κ), consistindo em 6 resíduos) no domínio VL (Morea et al., Methods 20: 267 a 279 (2000)). A primeira, segunda e terceira alças hipervariáveis do domínio VH são aqui referidas como H1, H2 e H3 e podem ser definidas como compreendendo os resíduos 25-33 (H1, consistindo em 7, 8 ou 9 resíduos), 52-56 (H2, consistindo em 3 ou 4 resíduos) e 91-105 (H3, altamente variável em comprimento) no domínio VH (Morea et al., Methods 20: 267 a 279 (2000)).

[0092] A menos que indicado de outra forma, os termos L1, L2 e L3 se referem, respectivamente, a primeira, segunda e terceira alças hipervariáveis de um domínio VL e abrangem as alças hipervariáveis obtidas dos isotipos Vkappa e Vlambda. Os termos H1, H2 e H3 referem-se, respectivamente, a primeira, segunda e terceira alças hipervariáveis do domínio VH e abrangem alças hipervariáveis obtidas a partir de qualquer um dos isotipos de cadeia pesada conhecidos, incluindo γ, ε, δ, α ou μ.

[0093] As alças hipervariáveis L1, L2, L3, H1, H2 e H3 podem, cada uma, compreender parte de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR", conforme definido abaixo. Os termos "alça hipervariável" e "região determinante de complementaridade" não são estritamente sinônimos, uma vez que as alças hipervariáveis (HVs) são definidas com base na estrutura, enquanto as regiões

determinantes de complementaridade (CDRs) são definidas com base na variabilidade da sequência (Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) e os limites dos HVs e das CDRs podem ser diferentes em alguns domínios VH e VL.

[0094] Os CDRs dos domínios VL e VH podem ser tipicamente definidos como compreendendo os seguintes aminoácidos: resíduos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) e 89-97 (LCDR3) no domínio variável da cadeia leve e resíduos 31-35 ou 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) e 95-102 (HCDR3) no domínio variável da cadeia pesada; (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Assim, os HVs podem estar incluídos nas CDRs correspondentes e as referências aqui às "alças hipervariáveis" dos domínios VH e VL devem ser interpretadas como abrangendo também as CDRs correspondentes e vice-versa, a menos que indicado de outra forma.

[0095] As porções mais conservadas dos domínios variáveis são chamadas de região estrutural (FR), conforme definido abaixo. Os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas compreendem, cada um, quatro FRs (FR1, FR2, FR3 e FR4, respectivamente), adotando amplamente uma configuração de folha β, conectada por três alças

hipervariáveis. As alças hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas FRs e, com as alças hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação ao antígeno dos anticorpos. A análise estrutural de anticorpos revelou a relação entre a sequência e a forma do sítio de ligação formado pelas regiões determinantes de complementaridade (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 799 a 817 (1992)); Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol, 215:175 a 182 (1990)). Apesar de sua alta variabilidade de sequência, cinco das seis alças adotam apenas um pequeno repertório de conformações da cadeia principal, chamadas de "estruturas canônicas". Essas conformações são determinadas, em primeiro lugar, pelo comprimento das alças e, em segundo lugar, pela presença de resíduos-chave em certas posições nas alças e nas regiões da estrutura que determinam a conformação por meio de seu empacotamento, ligações de hidrogênio ou a capacidade de assumir conformações de cadeia principal incomuns.

[0096] **"CDR"** - Como aqui usado, o termo "CDR" ou "região determinante de complementaridade" significa os sítios de ligação ao antígeno não contíguos encontrados na região variável de ambos os polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Essas regiões específicas foram descritas por Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6.609 a 6.616 (1977) e Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), e

por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901 a 917 (1987) e por MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732 a 745 (1996) onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparados entre si. Os resíduos de aminoácidos que abrangem as CDRs, conforme definidos por cada uma das referências citadas acima, são apresentados para comparação. De preferência, o termo "CDR" é uma CDR conforme definido por Kabat com base em comparações de sequência.

Tabela 1: Definições de CDR

	Definições de CDR		
	Kabat[1]	Chothia[2]	MacCallum[3]
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

[1]A numeração dos resíduos segue a nomenclatura de Kabat *et al.*, supra

[2]A numeração dos resíduos segue a nomenclatura de Chontia *et al.*, supra

[3]A numeração dos resíduos segue a nomenclatura de MacCallum *et al.*, supra

[0097] **"Região estrutural"** - O termo "região estrutural" ou "região FR", como aqui usado, inclui os resíduos de aminoácidos que fazem parte da região variável,

mas não fazem parte das CDRs (por exemplo, com o uso da definição de Kabat de CDRs). Portanto, uma estrutura de região variável tem entre cerca de 100 a 120 aminoácidos de comprimento, mas inclui apenas aqueles aminoácidos fora das CDRs. Para o exemplo específico de um domínio variável de cadeia pesada e para as CDRs conforme definido por Kabat et al., a região estrutural 1 corresponde ao domínio da região variável que abrange os aminoácidos 1-30; a região estrutural 2 corresponde ao domínio da região variável que abrange os aminoácidos 36-49; a região estrutural 3 corresponde ao domínio da região variável que engloba os aminoácidos 66-94 e a região estrutural 4 corresponde ao domínio da região variável desde os aminoácidos 103 até ao final da região variável. As regiões estruturais para a cadeia leve são separadas de forma similar por cada uma das CDRs da região variável da cadeia leve. Da mesma forma, com o uso da definição de CDRs de Chothia *et al*. ou McCallum *et al*., os limites da região estrutural são separados pelos respectivos terminais CDR conforme descrito acima. Em modalidades preferenciais, as CDRs são conforme definidos por Kabat.

[0098] Em anticorpos de ocorrência natural, as seis CDRs presentes em cada anticorpo monomérico são sequências curtas não contíguas de aminoácidos que são posicionadas especificamente para formar o sítio de ligação ao antígeno conforme o anticorpo assume sua configuração tridimensional

em um ambiente aquoso. O restante dos domínios variáveis pesados e leves mostram menos variabilidade inter-molecular na sequência de aminoácidos e são denominados regiões estruturais. As regiões de estrutura adotam amplamente uma conformação de folha β e as CDRs formam alças que se conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha β. Assim, essas regiões estruturais atuam para formar um andaime que fornece o posicionamento das seis CDRs na orientação correta por interações não covalentes entre cadeias. O sítio de ligação ao antígeno formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítopo no antígeno imunorreativo. Essa superfície complementar promove a ligação não covalente do anticorpo ao epítopo do antígeno imunorreativo. A posição dos CDRs pode ser facilmente identificada por uma pessoa com habilidade comum na técnica.

[0099] **"Região de dobradiça"** - Como usado aqui, o termo "região de dobradiça" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que une o domínio CH1 ao domínio CH2. Essa região de dobradiça compreende aproximadamente 25 resíduos e é flexível, que permite, dessa forma, que as duas regiões de vínculo de antígeno de N-terminal se movam independentemente. Regiões de dobradiça podem ser subdivididas em três domínios distintos: domínios de dobradiça superior, mediano e inferior (Roux K.H. *et al*. J. Immunol. 161:4083-90 1998). Os anticorpos da invenção que

compreendem uma região de dobradiça "totalmente humana" podem conter uma das sequências de região de dobradiça mostradas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Sequências de dobradiça humana

IgG	Dobradiça superior	Dobradiça mediana	Dobradiça inferior
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:142)	CPPCP (SEQ ID NO:143)	APELLGGP (SEQ ID NO: 144)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 145)	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$ (SEQ ID NO: 146)	APELLGGP (SEQ ID NO: 147)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO: 148)	CPSCP (SEQ ID NO: 149)	APEFLGGP (SEQ ID NO: 150)
IgG42	ERK (SEQ ID NO: 151)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO: 152)	APPVAGP (SEQ ID NO: 153)

[00100] **"Domínio CH2"** - Como aqui usado, o termo "domínio CH2" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que se estende, por exemplo, de cerca do resíduo 244 ao resíduo 360 de um anticorpo com o uso de esquemas de numeração convencionais (resíduos 244 a 360, sistema de numeração de Kabat; e resíduos 231 a 340, sistema de numeração da UE, Kabat EA *et al*. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). O domínio CH2 é único por não estar intimamente emparelhado com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de carboidratos ramificadas ligadas a N são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG nativa intacta. Também está bem documentado que o domínio CH3 se estende desde o domínio CH2 até o terminal C da molécula de IgG e compreende aproximadamente 108 resíduos.

[00101] **"Fragmento"** - O termo "fragmento", conforme usado no contexto de anticorpos da invenção, se refere a uma parte ou porção de um anticorpo ou cadeia de anticorpo que compreende menos resíduos de aminoácidos do que um anticorpo ou cadeia de anticorpo intacto ou completo. O termo "fragmento de ligação ao antígeno" se refere a um fragmento de polipeptídeo de uma imunoglobulina ou anticorpo que se liga ao antígeno ou compete com o anticorpo intacto (ou seja, com o anticorpo intacto do qual foram derivados) pela ligação ao antígeno (ou seja, ligação específica à galectina-10). Como usado aqui, o termo "fragmento" de uma molécula de anticorpo inclui fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos, por exemplo, um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL), um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH), um anticorpo de cadeia única (scFv), um fragmento F(ab')2, um fragmento Fab, um fragmento Fd, um fragmento Fv, um anticorpo de um braço (monovalente), diacorpos, triacorpos, tetracorpos ou qualquer molécula de ligação ao antígeno formada por combinação, montagem ou conjugação de tais fragmentos de ligação ao antígeno. O termo "fragmento de ligação ao antígeno", como aqui usado, destina-se ainda a abranger fragmentos de anticorpo selecionados do grupo que consiste em unicorpos, anticorpos de domínio e nanocorpos. Os fragmentos podem ser obtidos, por exemplo, por meio de tratamento químico ou enzimático de um anticorpo

intacto ou completo ou cadeia de anticorpo ou por meios recombinantes.

[00102] **"Fab"** - Um "Fab" ou "fragmento Fab" se refere a uma molécula composta por uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia leve consiste no domínio VL e no domínio constante (CL, Cκ ou Cλ) e a cadeia pesada consiste no VH domínio e o domínio CH1 apenas. Um fragmento Fab é tipicamente um braço de uma molécula de imunoglobulina em forma de Y. Um fragmento Fab pode ser gerado a partir de uma molécula de imunoglobulina pela ação da enzima papaína. A papaína cliva as moléculas de imunoglobulina na região da dobradiça de modo a produzir dois fragmentos Fab e uma região Fc separada.

[00103] **"scFv" ou "fragmento scFv" – Um fragmento scFv ou scFv significa um fragmento variável de cadeia única.** Um scFv é uma proteína de fusão de um domínio VH e um domínio VL de um anticorpo conectado por meio de um ligante.

[00104] **"Valência"**- Como aqui usado, o termo "valência" se refere ao número de potenciais sítios de ligação ao alvo em um polipeptídeo. Cada sítio de ligação ao alvo se liga especificamente a uma molécula alvo ou sítio específico em uma molécula alvo. Quando um polipeptídeo compreende mais de um sítio de ligação ao alvo, cada sítio de ligação ao alvo pode se ligar especificamente às mesmas moléculas ou moléculas diferentes (por exemplo, pode ligar-

se a diferentes ligantes ou antígenos diferentes, ou epítopos diferentes no mesmo antígeno).

[00105] **"Especificidade"** - O termo "especificidade" se refere à capacidade de se ligar (por exemplo, imunorreagir com) um determinado alvo, por exemplo, galectina-10. Um polipeptídeo pode ser monoespecífico e conter um ou mais sítios de ligação que se ligam especificamente a um alvo ou um polipeptídeo pode ser multiespecífico e conter dois ou mais sítios de ligação que se ligam especificamente aos mesmos ou diferentes alvos.

[00106] **"Sintético"** - Como aqui usado, o termo "sintético" em relação aos polipeptídeos inclui polipeptídeos que compreendem uma sequência de aminoácidos que não ocorre naturalmente. Por exemplo, polipeptídeos de ocorrência não natural que são formas modificadas de polipeptídeos de ocorrência natural (por exemplo, que compreendem uma mutação como uma adição, substituição ou deleção) ou que compreendem uma primeira sequência de aminoácidos (que pode ou não ocorrer naturalmente) que está ligado em uma sequência linear de aminoácidos a uma segunda sequência de aminoácidos (que pode ou não ocorrer naturalmente) à qual não está naturalmente ligado na natureza.

[00107] **"Manipulado"** - Como aqui usado, o termo "manipulado" inclui a manipulação de ácido nucleico ou

moléculas de polipeptídeo por meios sintéticos (por exemplo, por técnicas recombinantes, síntese de peptídeos *in vitro*, por acoplamento enzimático ou químico de peptídeos ou alguma combinação dessas técnicas). De preferência, os anticorpos da invenção são manipulados, incluindo, por exemplo, anticorpos humanizados e/ou quiméricos e anticorpos que foram manipulados para melhorar uma ou mais propriedades, como ligação ao antígeno, estabilidade/meia-vida ou função efetora.

[00108] **"Anticorpo modificado"** - Como aqui usado, o termo "anticorpo modificado" inclui formas sintéticas de anticorpos que são alteradas de modo que não ocorram naturalmente, por exemplo, anticorpos que compreendem pelo menos duas porções de cadeia pesada, mas não duas cadeias pesadas completas (como anticorpos de domínio excluído ou minicorpos); formas multiespecíficas de anticorpos (por exemplo, biespecíficos, triespecíficos, etc.) alterados para se ligar a dois ou mais antígenos diferentes ou a epítopos diferentes em um único antígeno); moléculas de cadeia pesada unidas a moléculas de scFv e similares. As moléculas de scFv são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, na patente nº U.S. 5.892.019. Além disso, o termo "anticorpo modificado" inclui formas multivalentes de anticorpos (por exemplo, trivalentes, tetravalentes, etc., anticorpos que se ligam a três ou mais cópias do mesmo antígeno). Em outra

modalidade, um anticorpo modificado da invenção é uma proteína de fusão compreendendo pelo menos uma porção da cadeia pesada sem um domínio CH2 e que compreende um domínio de ligação de um polipeptídeo que compreende a porção de ligação de um membro de um par de ligantes de receptor.

[00109] O termo "anticorpo modificado" também pode ser usado neste documento para se referir a variantes de sequência de aminoácidos dos anticorpos da invenção, conforme estruturalmente definido neste documento. Será entendido por uma pessoa com habilidade comum na técnica que um anticorpo pode ser modificado para produzir um anticorpo variante que varia na sequência de aminoácidos em comparação com o anticorpo do qual foi derivado. Por exemplo, substituições de nucleotídeos ou aminoácidos que levam a substituições conservativas ou mudanças em resíduos de aminoácidos "não essenciais" podem ser realizadas (por exemplo, em CDR e/ou resíduos estruturais). As substituições de aminoácidos podem incluir a substituição de um ou mais aminoácidos por um aminoácido de ocorrência natural ou não natural.

[00110] "**Substituições humanizantes**" - Como aqui usado, o termo "substituições humanizantes" se refere a substituições de aminoácidos em que o resíduo de aminoácido presente em uma posição particular no domínio VH ou VL de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo galectina-10 derivado

de camelídeo) é substituído por um resíduo de aminoácido que ocorre em uma posição equivalente em um domínio VH ou VL humano de referência. O domínio VH ou VL humano de referência pode ser um domínio VH ou VL codificado pela linha germinativa humana. As substituições humanizantes podem ser realizadas nas regiões estruturais e/ou nos CDRs dos anticorpos, aqui definidos.

[00111] **"Variantes humanizadas" -** Como aqui usado, o termo "variante humanizada" se refere a um anticorpo variante que contém uma ou mais "substituições humanizantes" em comparação com um anticorpo de referência, em que uma porção do anticorpo de referência (por exemplo, o domínio VH e/ou o domínio VL ou partes do mesmo contendo pelo menos um CDR) tem um aminoácido derivado de uma espécie não humana, e as "substituições humanizantes" ocorrem dentro da sequência de aminoácidos derivada de uma espécie não humana.

[00112] **"Variantes germinado"** - O termo "variante germinada" é usado neste documento para se referir especificamente a "variantes humanizadas" em que as "substituições humanizantes" resultam na substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos presentes em uma posição (ou posições) particular no domínio VH ou VL de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo galectina-10 derivado de camelídeo) com um resíduo de aminoácido que ocorre em uma posição equivalente em um domínio VH ou VL humano de

referência codificado pela linha germinativa humana. É típico que, para qualquer "variante germinada" dada, os resíduos de aminoácidos de substituição substituídos na variante germinada são retirados exclusivamente, ou predominantemente, de um único domínio VH ou VL codificado por linha germinativa humana. Os termos "variante humanizada" e "variante germinada" são frequentemente usados de forma intercambiável neste documento. A introdução de uma ou mais "substituições humanizantes" em um domínio VH ou VL derivado de camelídeo (por exemplo, derivado de lama) resulta na produção de uma "variante humanizada" do domínio VH ou VL derivado de camelídeo (lama). Se os resíduos de aminoácidos substituídos são derivados predominante ou exclusivamente de uma única sequência de domínio VH ou VL codificada por linha germinativa humana, então o resultado pode ser uma "variante germinada humana" do domínio VH ou VL derivado de camelídeo (lama).

[00113] **"Variantes de afinidade"** - Como aqui usado, o termo "variante de afinidade" se refere a um anticorpo variante que exibe uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos em comparação com um anticorpo de referência, em que a variante de afinidade exibe uma afinidade alterada para o antígeno alvo em comparação com o anticorpo de referência. Por exemplo, as variantes de afinidade exibirão uma afinidade alterada para a galectina-10, em comparação

com o anticorpo galectina-10 de referência. De preferência, a variante de afinidade exibirá afinidade melhorada para o antígeno alvo, por exemplo, galectina-10, em comparação com o anticorpo de referência. As variantes de afinidade exibem tipicamente uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos nas CDRs, em comparação com o anticorpo de referência. Essas substituições podem resultar na substituição do aminoácido original presente em uma determinada posição nas CDRs por um resíduo de aminoácido diferente, que pode ser um resíduo de aminoácido de ocorrência natural ou um resíduo de aminoácido de ocorrência não natural. As substituições de aminoácidos podem ser conservativas ou não conservativas.

[00114] **"Alta homologia humana"** - Um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) pode ser considerado como tendo alta homologia humana se os domínios VH e os domínios VL, tomados em conjunto, exibem pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências VH e VL da linha germinativa humana mais próximas correspondentes. Os anticorpos com alta homologia humana podem incluir anticorpos que compreendem domínios VH e VL de anticorpos nativos não humanos que exibem percentual de identidade de sequência suficientemente alto para sequências de linha germinativa humana, incluindo, por exemplo,

anticorpos que compreendem domínios VH e VL de anticorpos convencionais de camelídeo, bem como manipulados, especialmente humanizado ou germinados, variantes de tais anticorpos e também anticorpos “totalmente humanos”.

[00115] Em uma modalidade, o domínio VH do anticorpo com alta homologia humana pode exibir uma identidade de sequência de aminoácidos ou homologia de sequência de 80% ou mais com um ou mais domínios VH humanos nas regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4. Em outras modalidades, a identidade de sequência de aminoácidos ou homologia de sequência entre o domínio VH do polipeptídeo da invenção e a sequência de domínio VH da linha germinativa humana mais próxima pode ser 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais, 97% ou maior, ou até 99% ou mesmo 100%.

[00116] Em uma modalidade, o domínio VH do anticorpo com alta homologia humana pode conter uma ou mais (por exemplo, 1 a 10) correspondências incorretas de sequência de aminoácidos nas regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4, em comparação com a sequência VH humana de correspondência mais próxima.

[00117] Em outra modalidade, o domínio VL do anticorpo com alta homologia humana pode exibir uma identidade de sequência ou homologia de sequência de 80% ou mais com um ou mais domínios VL humanos nas regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4. Em outras modalidades, a identidade de sequência

de aminoácidos ou homologia de sequência entre o domínio VL do polipeptídeo da invenção e a sequência de domínio VL da linha germinativa humana mais próxima pode ser 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais, 97% ou maior, ou até 99% ou mesmo 100%.

[00118] Em uma modalidade, o domínio VL do anticorpo com alta homologia humana pode conter uma ou mais (por exemplo, 1 a 10) correspondências incorretas de sequência de aminoácidos nas regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4, em comparação com a sequência VL humana de correspondência mais próxima.

B. Antagonistas de Galectina-10

[00119] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um antagonista que se liga a galectina-10, em que o antagonista se liga a um epítopo de galectina-10 e, assim, protege uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10. A presente invenção fornece ainda um antagonista que se liga à galectina-10, que, quando ligado à galectina-10 solúvel, inibe a cristalização da galectina-10. A presente invenção fornece ainda um antagonista que se liga à galectina-10, que, quando ligado à galectina-10 cristalina, promove a dissolução da galectina-10 cristalina. Os antagonistas da invenção ligam-se preferencialmente à galectina-10 humana.

[00120] A proteína galectina-10 é uma proteína de

ligação ao glicano relativamente pequena (16,5 kDa). As proteínas galectina-10 formam dímeros em solução e também podem formar cristais bipiramidais hexagonais insolúveis. Esses cristais foram observados pela primeira vez em pacientes com asma alérgica e infecções parasitárias e são também conhecidos como cristais de Charcot-Leyden (ou CLCs).

[00121] Os antagonistas da presente invenção ligam-se a um epítopo de galectina-10. O epítopo pode ser um epítopo linear, isto é, pode consistir em dois ou mais aminoácidos consecutivos na sequência da proteína primária de galectina-10. Alternativamente, o epítopo pode ser um epítopo conformacional que compreende ou que consiste em dois ou mais aminoácidos que não estão localizados adjacentes um ao outro na sequência da proteína primária de galectina-10. Para modalidades em que o antagonista se liga a um epítopo conformacional, os dois ou mais aminoácidos do epítopo estarão tipicamente localizados em estreita proximidade dentro da estrutura tridimensional da proteína galectina-10. Os epítopos aos quais os antagonistas de galectina-10 da invenção se ligam podem compreender ou consistir em pelo menos dois aminoácidos, pelo menos três aminoácidos, pelo menos quatro aminoácidos, pelo menos cinco aminoácidos, pelo menos seis aminoácidos, pelo menos sete aminoácidos. Em certas modalidades, os epítopos aos quais os antagonistas de galectina-10 se ligam compreendem ou

consistem em 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos.

[00122] Os antagonistas da invenção ligam-se a um epítopo de galectina-10 e, assim, protegem uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10. Conforme definido em outro lugar neste documento, uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10 é um remendo de superfície de aminoácidos que contata uma ou mais moléculas vizinhas de galectina-10 na rede cristalina. Ao se ligar a um epítopo de galectina-10 que serve para proteger uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10, os antagonistas da invenção interrompem a cristalização de galectina-10. Segue-se que os antagonistas da invenção podem proteger uma interface de empacotamento de cristal total ou parcialmente, desde que o antagonista interrompa a cristalização de galectina-10. Em certas modalidades, os antagonistas, quando ligados à galectina-10 solúvel, inibem a cristalização da galectina-10. Em certas modalidades, os antagonistas, quando ligados à galectina-10 cristalina, promovem a dissolução da galectina-10.

[00123] As propriedades antagonistas dos antagonistas de galectina-10 aqui descritos podem ser medidas de acordo com os ensaios aqui descritos. Por exemplo, os antagonistas de galectina-10, incluindo anticorpos de galectina-10, podem ser incubados com galectina-10 solúvel em condições

experimentais que favorecem a cristalização de galectina-10 e a capacidade dos antagonistas para inibir esse processo pode ser medida. A atividade inibitória dos antagonistas da galectina-10 pode ser medida em relação a um controle, por exemplo, um antagonista que não se liga à galectina-10. A atividade inibitória dos antagonistas da galectina-10 também pode ser medida em relação a um controle que é uma molécula de ligação à galectina-10 sem atividade inibitória da cristalização. Os antagonistas de galectina-10 podem inibir a cristalização de galectina-10 em 100% em relação ao controle, em 90% em relação ao controle, em 80% em relação ao controle, em 70% em relação ao controle.

[00124] Alternativamente, os antagonistas de galectina-10, incluindo anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser incubados com cristais de galectina-10 pré-formados e a capacidade de os antagonistas dissolverem os cristais pode ser medida ao longo de um período de tempo adequado. Os cristais de galectina-10 podem ser cristais recombinantes formados a partir de galectina-10 recombinante produzida *in vitro*. Alternativamente, os cristais de galectina-10 podem ser cristais obtidos de uma amostra de paciente, por exemplo, cristais obtidos de pólipos dentro das cavidades nasais ou sinusais de um paciente. Em certas modalidades, os antagonistas de galectina-10 da invenção podem ter a

capacidade de dissolver cristais de galectina-10 pré-formados ao longo de um período de até 10 horas, até 12 horas, até 14 horas, até 16 horas, até 18 horas, até 20 horas. Os antagonistas da galectina-10 podem dissolver os cristais completamente, isto é, em 100%. Alternativamente, os antagonistas de galectina-10 podem dissolver os cristais de modo que mais de 50% dos cristais sejam dissolvidos, mais de 60% ou os cristais sejam dissolvidos, mais de 70% dos cristais sejam dissolvidos, mais de 80% dos cristais sejam dissolvidos, mais 90% dos cristais são dissolvidos ao longo do tempo.

[00125] Em certas modalidades, o antagonista de galectina-10 protege uma interface de empacotamento de cristal ligando-se a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10. Os aminoácidos da galectina-10 que formam as interfaces de empacotamento de cristal são normalmente identificados como: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141, em que as posições

são definidas com referência à SEQ ID NO: 141. Assim, em certas modalidades, os antagonistas de galectina-10 da invenção se ligam a um epítopo que compreende um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais , nove ou mais, dez ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141. Em certas modalidades, o epítopo consiste inteiramente em aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10. Por exemplo, o epítopo pode consistir em 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10. Alternativamente, o epítopo pode compreender aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal e, adicionalmente, compreender pelo menos um aminoácido de fora dos aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10.

[00126] Em modalidades preferenciais, o antagonista se liga a um epítopo que compreende Tyr69. Alternativamente

ou adicionalmente, o antagonista pode preferencialmente ligar-se a um epítopo que compreende um aminoácido adjacente a Tyr69, especificamente Glu68 ou Gly70. Em uma modalidade, o antagonista se liga a um epítopo que compreende Glu68, Tyr69 e Gly70.

[00127] Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117 e Ala120. Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117, GLu119, Ala120 e Lys122. Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Asp98, His114, Arg115, Ile116, Lys117, GLu119, Ala120 e Lys122.

[00128] Em certas modalidades, o antagonista se liga a um epítopo que compreende os aminoácidos: Glu33, Gly59, Arg60 e Lys79. O epítopo pode compreender adicionalmente os aminoácidos: Gln74, Gln75 e Glu77.

[00129] Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Leu31, Glu33, Gly59, Arg60, Ser78, Lys79,

Asn80, Met81, Pro82 e Gln84.

[00130] Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 e Ser109. Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Glu33, Gly59, Arg60, Trp72, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Gln84 e Ser109. Em uma modalidade particular, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Phe83, Gln84.

[00131] Em uma modalidade alternativa, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Thr42, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119 e Ala120. Em uma outra modalidade, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Glu43, Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Lys117, Glu119 e Ala120. Em uma modalidade adicional, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Gln74, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Ile116 e Lys117. Em uma modalidade adicional, o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos: Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9,

Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 e Phe135.

[00132] As posições de aminoácidos da galectina-10 são identificadas em relação à proteína humana mostrada como SEQ ID NO: 141.

[00133] Em certas modalidades, o antagonista se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos da interface de dimerização da galectina-10. Os aminoácidos da galectina-10 que formam o domínio de dimerização podem diferir dos aminoácidos que participam das interfaces de empacotamento de cristais. No entanto, é possível que um antagonista que se liga a aminoácidos localizados na interface de dimerização também proteja as interfaces de empacotamento de cristal e, assim, interrompa a cristalização de galectina-10. Os aminoácidos da galectina-10 que formam a interface de dimerização são normalmente identificados como: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 e Asp129. Assim, em certas modalidades, os antagonistas de galectina-10 da invenção se ligam a um epítopo que compreende ou consiste em um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais , nove ou mais, dez ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29,

Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 e Asp129. As posições de aminoácidos da galectina-10 são identificadas em relação à SEQ ID NO: 141.

[00134] Em certas modalidades, os antagonistas de galectina-10 da invenção se ligam a um epítopo de galectina-10 que compreende um ou mais aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal e um ou mais aminoácidos da interface de dimerização. O um ou mais aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal e o um ou mais aminoácidos da interface de dimerização podem ser qualquer um dos aminoácidos específicos identificados acima. Em modalidades preferenciais, os antagonistas da invenção ligam-se a um epítopo que compreende Glu68, Tyr69 e Gly70.

C. Anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos

[00135] Em modalidades preferenciais, os antagonistas de galectina-10 da presente invenção são anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. O termo “anticorpo” aqui é usado no sentido mais amplo e abrange, sem limitação, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos VHH, desde que os mesmos exibam a especificidade imunológica apropriada para a proteína

galectina-10. Os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos podem exibir especificidade imunológica para qualquer um dos epítopos de galectina-10 descritos na seção B acima.

[00136] O termo "monoclonal anticorpo" conforme comparado no presente documento, se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos exceto para possíveis mutações naturalmente ocorrentes que podem estar presentes em menores quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, que são direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos) no antígeno, cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante ou epítopo no antígeno.

[00137] "Fragmentos de anticorpos" ou "fragmentos de ligação ao antígeno" compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a ligação ao antígeno ou domínio variável do mesmo. Os fragmentos de anticorpos são descritos em outro lugar neste documento e exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')2, fragmentos de Fab bi-específicos e Fv, diacorpos, anticorpos

lineares, moléculas de anticorpo de cadeia única, um fragmento variável de cadeia única (scFv) e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos (consulte Holliger e Hudson, Nature Biotechnol. 23:1126-36 (2005), cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

[00138] Os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos destinam-se ao uso terapêutico humano e, portanto, serão tipicamente imunoglobulinas do tipo IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, frequentemente do tipo IgG, caso em que podem pertencer a qualquer uma das quatro subclasses IgG1, IgG2a e b, IgG3 ou IgG4. Em modalidades preferenciais, os anticorpos de galectina-10 são anticorpos IgG. São particularmente preferenciais os anticorpos IgG1. Os anticorpos monoclonais são preferenciais, uma vez que são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Em certas modalidades preferenciais, os fragmentos de ligação ao antígeno de galectina-10 são fragmentos Fab ou “Fabs”.

[00139] Os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem exibir alta homologia humana, conforme definido em outro lugar neste documento. Tais moléculas de anticorpo com alta homologia humana podem incluir anticorpos que compreendem domínios VH e VL de anticorpos nativos não humanos que exibem percentual de

identidade de sequência suficientemente alto para sequências de linha germinativa humana. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos são variantes humanizadas ou germinadas de anticorpos não humanos.

[00140] Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos podem ser derivados de camelídeos. Os anticorpos derivados de camelídeos podem ser anticorpos apenas de cadeia pesada, isto é, anticorpos VHH ou podem ser anticorpos heterotetraméricos convencionais. Em modalidades preferenciais, os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno são derivados de anticorpos heterotetraméricos de camelídeos. Em outras modalidades preferenciais, os anticorpos de galectina-10 são anticorpos VHH ou são derivados de anticorpos VHH.

[00141] Por exemplo, os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno podem ser selecionados a partir de bibliotecas imunes obtidas por um método que compreende a etapa de imunização de um camelídeo com o alvo de interesse, isto é, galectina-10. O camelídeo pode ser imunizado com a proteína alvo ou fragmento de polipeptídeo desta, ou com uma molécula de mRNA ou molécula de cDNA que expressa a proteína ou um fragmento de polipeptídeo da mesma. Métodos para produzir anticorpos em espécies de camelídeos

e selecionar anticorpos contra alvos preferenciais de bibliotecas imunes a camelídeos são descritos, por exemplo, no pedido de patente internacional nº WO2010/001251, aqui incorporado a título de referência.

[00142] Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno podem ser derivados de camelídeos em que compreendem pelo menos uma alça hipervariável (HV) ou região determinante de complementaridade obtida de um domínio VH ou um domínio VL de uma espécie da família Camelidae. Em particular, os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender domínios VH e/ou VL, ou CDRs dos mesmos, obtidos por imunização ativa de camelídeos consanguíneos, por exemplo, lhamas, com galectina-10.

[00143] O termo "obtido de", neste contexto, implica uma relação estrutural, no sentido de que os HVs ou CDRs dos anticorpos incorporam uma sequência de aminoácidos (ou variantes menores dos mesmos) que foi originalmente codificada por um gene de imunoglobulina Camelidae. No entanto, isso não implica necessariamente uma relação particular em termos do processo de produção usado para preparar os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos.

[00144] Anticorpos derivados de camelídeos ou fragmentos de ligação a antígenos dos mesmos podem ser

derivados de qualquer espécie de camelídeos, incluindo, entre outros, lhama, dromedário, alpaca, vicunha, guanaco ou camelo.

[00145] Moléculas de anticorpo que compreendem domínios VH e VL derivados de camelídeos, ou CDRs dos mesmos, são tipicamente polipeptídeos expressos de forma recombinante e podem ser polipeptídeos quiméricos. O termo "polipeptídeo quimérico" se refere a um polipeptídeo artificial (de ocorrência não natural) que é criado pela justaposição de dois ou mais fragmentos de peptídeo que de outra forma não ocorrem de forma contígua. Incluídos nesta definição estão polipeptídeos quiméricos de "espécies" criados por justaposição de fragmentos de peptídeo codificados por duas ou mais espécies, por exemplo, camelídeo e humano.

[00146] Em certas modalidades, todo o domínio VH e/ou todo o domínio VL pode ser obtido de uma espécie da família Camelidae. O domínio VH derivado de camelídeo e/ou o domínio VL derivado de camelídeo podem então ser sujeitos à manipulação de proteínas, na qual uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos são introduzidas na sequência de aminoácidos de camelídeo. Essas alterações manipuladas incluem preferencialmente substituições de aminoácidos em relação à sequência de camelídeo. Tais mudanças incluem "humanização" ou "germinação" em que um ou

mais resíduos de aminoácidos em um domínio VH ou VL codificado por camelídeo são substituídos por resíduos equivalentes de um domínio VH ou VL codificado por humanos homólogo.

[00147] Os domínios VH e VL de camelídeo isolados obtidos por imunização ativa de um camelídeo (por exemplo, lama) com galectina-10 podem ser usados como uma base para a manipulação de anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno de acordo com a presente invenção. Partindo de domínios VH e VL de camelídeos intactos, é possível manipular uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos que partem da sequência de partida de camelídeos. Em certas modalidades, tais substituições, inserções ou deleções podem estar presentes nas regiões estruturais do domínio VH e/ou do domínio VL.

[00148] Em outras modalidades, são fornecidas moléculas de anticorpo "quiméricas" que compreendem domínios VH e VL derivados de camelídeos (ou variantes manipuladas dos mesmos) e um ou mais domínios constantes de um anticorpo não camelídeo, por exemplo, domínios constantes codificados por humanos (ou variantes manipuladas do mesmo). Em tais modalidades, é preferencial que tanto o domínio VH quanto o domínio VL sejam obtidos da mesma espécie de camelídeo, por exemplo, tanto VH e VL podem ser de Lama glama ou ambos VH e VL podem ser de Lama pacos (antes da introdução de variação

da sequência de aminoácidos manipulada). Em tais modalidades, tanto o domínio VH quanto o domínio VL podem ser derivados de um único animal, particularmente um único animal que foi ativamente imunizado com o antígeno de interesse.

[00149] Como uma alternativa para alterações de manipulação na sequência de aminoácidos primária dos domínios VH e/ou VL de Camelidae, alças hipervariáveis derivadas de camelídeos individuais ou CDRs, ou combinações dos mesmos, podem ser isoladas de domínios VH/VL de camelídeos e transferidas para uma estrutura alternativa (ou seja, não Camelidae), por exemplo, uma estrutura VH/VL humana, por enxerto de CDR.

[00150] Em modalidades não limitativas, os anticorpos de galectina-10 podem compreender domínios CH1 e/ou domínios CL (da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente), cuja sequência de aminoácidos é total ou substancialmente humana. Para moléculas de anticorpo destinadas ao uso terapêutico humano, é típico para toda a região constante do anticorpo, ou pelo menos uma parte do mesmo, ter uma sequência de aminoácidos completa ou substancialmente humana. Portanto, um ou mais ou qualquer combinação do domínio CH1, região de dobradiça, domínio CH2, domínio CH3 e domínio CL (e domínio CH4 se presente) pode ser total ou substancialmente humano em relação à sua sequência de

aminoácidos. O domínio CH1, a região de dobradiça, o domínio CH2, o domínio CH3 e/ou o domínio CL (e/ou o domínio CH4 se presente) podem ser derivados de um anticorpo humano, de preferência um anticorpo IgG humano, mais preferencialmente um anticorpo IgG1 humano do subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

[00151] Vantajosamente, o domínio CH1, região de dobradiça, domínio CH2, domínio CH3 e domínio CL (e domínio CH4 se presente) podem todos ter sequência de aminoácidos completa ou substancialmente humana. No contexto da região constante de um anticorpo humanizado ou quimérico, ou fragmento de anticorpo, o termo "substancialmente humano" se refere a uma identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 90%, ou pelo menos 92%, ou pelo menos 95%, ou pelo menos 97%, ou pelo menos 99% com uma região constante humana. O termo "sequência de aminoácidos humana", neste contexto, se refere a uma sequência de aminoácidos que é codificada por um gene de imunoglobulina humana, que inclui genes da linha germinativa, rearranjados e mutados somaticamente. A invenção também contempla polipeptídeos que compreendem domínios constantes de sequência "humana" que foram alterados, por uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos em relação à sequência humana, exceto aquelas modalidades em que a presença de uma região dobradiça "totalmente humana" é expressamente exigida.

[00152] Os anticorpos de galectina-10 podem ter uma

ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos na região constante da cadeia pesada e/ou leve, particularmente na região Fc. As substituições de aminoácidos podem resultar na substituição do aminoácido substituído por um aminoácido de ocorrência natural diferente ou por um aminoácido não natural ou modificado. Outras modificações estruturais também são permitidas, como, por exemplo, mudanças no padrão de glicosilação (por exemplo, por adição ou deleção de locais de glicosilação ligados a N ou O).

[00153] Os anticorpos de galectina-10 podem ser modificados dentro da região Fc para aumentar a afinidade de ligação para o receptor neonatal FcRn. A afinidade de ligação aumentada pode ser mensurável em pH ácido (por exemplo, de cerca de pH 5,5 a aproximadamente pH 6,0). A afinidade de ligação aumentada também pode ser mensurável em pH neutro (por exemplo, de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,4). Por "afinidade de ligação aumentada" entende-se a afinidade de ligação aumentada para FcRn em relação à região Fc não modificada. Normalmente, a região Fc não modificada possuirá a sequência de aminoácidos de tipo selvagem de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana. Em tais modalidades, a afinidade de ligação de FcRn aumentada da molécula de anticorpo que tem a região Fc modificada será medida em relação à afinidade de ligação de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 de tipo selvagem para

FcRn.

[00154] Em certas modalidades, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro da região Fc podem ser substituídos por um aminoácido diferente de modo a aumentar a ligação a FcRn. Várias substituições de Fc foram relatadas que aumentam a ligação de FcRn e, assim, melhoram a farmacocinética do anticorpo. Essas substituições são relatadas, por exemplo, em Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2):157-9; Hinton et al. (2006) *J Immunol.* 176:346 a 356; Yeung et al. (2009) *J Immunol.* 182:7.663 a 7.671; Presta LG. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460 a 470; e Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10):1283-88, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade.

[00155] Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 compreendem um domínio Fc de IgG humano modificado que compreende ou consiste nas substituições de aminoácidos H433K e N434F, em que a numeração do domínio Fc está de acordo com a numeração EU. Em outra modalidade, os anticorpos de galectina-10 aqui descritos compreendem um domínio Fc de IgG humano modificado que compreende ou consiste nas substituições de aminoácidos M252Y, S254T, T256E, H433K e N434F, em que a numeração do domínio Fc está de acordo com a numeração EU.

[00156] Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 compreendem um domínio Fc de IgG humano

modificado que consiste em até 2, até 3, até 4, até 5, até 6, até 7, até 8, até 9, até 10, até 12, até 15, até 20 substituições em relação à sequência de IgG de tipo selvagem correspondente.

[00157] Os anticorpos de galectina-10 também podem ser modificados de modo a formar imunoconjugados que compreendem um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos dos mesmos), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado). As regiões Fc também podem ser manipuladas para extensão de meia-vida, conforme descrito por Chan e Carter (2010) *Nature Reviews: Immunology* 10:301 a 316, incorporado aqui a título de referência.

[00158] Em ainda outra modalidade, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade de o anticorpo mediar a citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ através da modificação de um ou mais aminoácidos.

[00159] Em modalidades particulares, a região Fc pode ser manipulada de modo que não haja função efetora. Em certas modalidades, as moléculas de anticorpo da invenção podem ter uma região Fc derivada de isotipos IgG de ocorrência natural com função efetora reduzida, por exemplo, IgG4. As regiões Fc derivadas de IgG4 podem ser ainda modificadas para

aumentar a utilidade terapêutica, por exemplo, pela introdução de modificações que minimizam a troca de braços entre moléculas de IgG4 *in vivo*. As regiões Fc derivadas de IgG4 podem ser modificadas para incluir a substituição S228P.

[00160] Em certas modalidades, as moléculas de anticorpo são modificadas em relação à glicosilação. Por exemplo, um anticorpo aglicoslado pode ser produzido (isto é, o anticorpo não tem glicosilação). A glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno alvo. Essas modificações de carboidratos podem ser realizadas por; por exemplo, alterar um ou mais locais de glicosilação na sequência do anticorpo. Por exemplo, pode ser realizada uma ou mais substituições de aminoácidos que resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura da região variável para, desse modo, eliminar a glicosilação nesse sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno.

[00161] Também são considerados anticorpos variantes de galectina-10 com um tipo alterado de glicosilação, como um anticorpo hipofucosilado com quantidades reduzidas de resíduos de fucosil ou um anticorpo total ou parcialmente desfucosilado (conforme descrito por Natsume *et al*., Drug Design Development and Therapy, Volume 3, páginas 7 a 16, 2009) ou um anticorpo com estruturas GlcNac bissectantes aumentadas. Foi demonstrado que tais padrões de glicosilação

alterados aumentam a atividade ADCC de anticorpos, produzindo tipicamente 10 vezes o aumento de ADCC em relação a um anticorpo equivalente que compreende um domínio Fc humano "nativo". Tais modificações de carboidratos podem ser realizadas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria enzimática de glicosilação alterada (conforme descrito por Yamane-Ohnuki e Satoh, mAbs 1:3, 230 a 236, 2009). Exemplos de anticorpos não fucosilados com função ADCC melhorada são aqueles produzidos com o uso da tecnologia Potelligent™ da BioWa Inc.

D. Anticorpos de galectina-10 exemplificadores

[00162] A presente invenção fornece anticorpos de galectina-10 exemplificadores e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Esses anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno servem como antagonistas de galectina-10 preferenciais de acordo com a invenção. Os exemplos de anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno da invenção podem ser definidos exclusivamente em relação às suas características estruturais, conforme descrito abaixo.

[00163] É aqui fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH

e VL compreendem sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 3; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 2; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 58; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 57; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 56;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 5; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 61; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 60; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 59;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 9; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 8; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 7; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 64; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 62;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 12; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 10; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 15; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 14; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 13; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 70; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 69; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 68;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 18; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 17; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 16; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 72; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 20; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 19; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 75; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 74; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 73;

(viii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 23; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 22; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 21; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(ix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 25; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 24; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 77; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 76;

(x) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 28; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 27; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 26; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 79;

(xi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 31; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 30; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 29; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80;

(xii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 33; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 32; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 84; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 83; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 82;

(xiii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID

NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 35; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 34; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 87; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 86; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 85;

(xiv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 38; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 37; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 88;

(xv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 41; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 40; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 39; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 91; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 90; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 89;

(xvi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 43; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 42; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 92;

(xvii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

44; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xviii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 47; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 46; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 45; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(xix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 50; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 49; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 48; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xx) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 52; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 51; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 98; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80; e

(xxi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 55; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 54; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 53;

LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71.

[00164] Em certas modalidades, é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga à galectina-10, em que o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve, em que a sequência de CDR3 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:3 [DRNLGYRLGYPYDY] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 da cadeia pesada variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:2 [GISWNGGSTYYAESMKG] ou variante de sequência da mesma;

a sequência de CDR1 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:1 [DYAMS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR3 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:58 [ASYRSSNNAV] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 de cadeia leve variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:57 [EVNKRAS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR1 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:56 [AGTSSDVGYGNYVS] ou variante de

sequência da mesma; e

em que a variante de sequência compreende uma, duas ou três substituições de aminoácidos (por exemplo, substituições conservativas, substituições humanizantes ou variantes de afinidade) na sequência recitada.

[00165] Em certas modalidades, é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga à galectina-10, em que o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve, em que

a sequência de CDR3 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:6 [PGDRLWYYRYDY] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 da cadeia pesada variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:5 [AINSGGGSTSYADSVKG] ou variante de sequência da mesma;

a sequência de CDR1 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:4 [SYAMS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR3 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:61 [ASYRYRNNVV] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 de cadeia leve variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:60 [KVSRRAS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR1 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:59 [AGTSSDIGYGNYVS] ou variante de sequência da mesma; e

em que a variante de sequência compreende uma, duas ou três substituições de aminoácidos (por exemplo, substituições conservativas, substituições humanizantes ou variantes de afinidade) na sequência recitada.

[00166] Em certas modalidades, é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga à galectina-10, em que o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve, em que

a sequência de CDR3 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:9 [YIRGSSWSGWSAYDY] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 da cadeia pesada variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:8 [VIASDGSTYYSPSLKS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência de CDR1 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:7 [TSYYAWS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR3 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:64 [QSADSSDNPV] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 de cadeia leve variável compreende ou

consiste na SEQ ID NO:63 [KDSERPS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR1 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:62 [QGGNFGYYYGS] ou variante de sequência da mesma; e

em que a variante de sequência compreende uma, duas ou três substituições de aminoácidos (por exemplo, substituições conservativas, substituições humanizantes ou variantes de afinidade) na sequência recitada.

[00167] Em certas modalidades, é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga à galectina-10, em que o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável da cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve, em que

a sequência de CDR3 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:12 [RPNWYRALDA] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR2 da cadeia pesada variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:11 [AIAYSGSTYYSPSLKS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência de CDR1 de cadeia pesada variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:10 [TNSYYWS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR3 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:67 [QSYESSTSPV] ou variante de

sequência da mesma;

a sequência CDR2 de cadeia leve variável compreende ou consiste na SEQ ID NO:66 [GDSNRPS] ou variante de sequência da mesma;

a sequência CDR1 de cadeia leve variável compreende ou consiste em SEQ ID NO:65 [QGANLGRYYGI] ou variante de sequência da mesma; e

em que a variante de sequência compreende uma, duas ou três substituições de aminoácidos (por exemplo, substituições conservativas, substituições humanizantes ou variantes de afinidade) na sequência recitada.

[00168] Em certas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à galectina-10 são selecionados a partir de moléculas de anticorpo que compreendem ou consistem em um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 ou uma sequência de aminoácidos

pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL

que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(viii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ix) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(x) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 118 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xi) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiv) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 126 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos

90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xv) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvi) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xviii) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xix) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xx) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(xxi) um VH que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[00169] É aqui fornecido um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH e VL compreendem sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 162; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 161; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 160; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 179; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 178; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 177;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 182; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 168; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 167; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 166; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 185; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 184; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 183;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 171; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 170; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 169; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 187; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 186; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

174; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 173; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 172; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 189; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 188; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 176; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 175; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 192; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 191; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 190; e

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 193; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180.

[00170] Em certas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à galectina-10 são selecionados a partir de moléculas de anticorpo que compreendem ou consistem em um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos

90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 195 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que

compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 203 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 205 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 206 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[00171] Para modalidades em que os domínios dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são definidos por uma identidade de sequência de porcentagem particular para uma sequência de referência, os domínios VH e/ou VL podem reter sequências CDR idênticas àquelas presentes na sequência de referência de modo que a variação esteja presente apenas dentro das regiões-quadro.

[00172] É fornecido aqui um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo é um anticorpo VHH e em que o domínio VHH

compreende as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 210; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 209; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 213; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 212; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 216; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 215; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 219; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 218; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 222; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 221; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 225; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 224; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 228; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 227; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 231; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

230; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 238; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 237; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 241; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 240; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 239;

(xiii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xiv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 244; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 243; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 242;

(xv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xvi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 247; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 246; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 245; e

(xvii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 249; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 248; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217.

[00173] Em certas modalidades, os anticorpos VHH que se ligam a galectina-10 compreendem um domínio VHH que compreendem ou consistem em uma molécula de anticorpo selecionada que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada por qualquer uma das SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265 ou 266, ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

[00174] Para modalidades em que os domínios VHH são definidos por uma identidade de sequência de porcentagem particular com uma sequência de referência, o domínio VHH pode reter sequências CDR idênticas àquelas presentes na sequência de referência de modo que a variação esteja presente apenas nas regiões estruturais.

[00175] A invenção também fornece anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam ao mesmo epítopo que os anticorpos de galectina-10 aqui exemplificados.

[00176] Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 exemplificadores e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos definidos como tendo as sequências CDR recitadas acima ou definidas como tendo uma identidade de

porcentagem particular com as sequências de aminoácidos do domínio VH/VL/VHH específicas citadas acima são humanizadas, germinadas ou variantes de afinidade dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos quais derivam as sequências CDR, VH, VL e/ou VHH.

[00177] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de anticorpo de galectina-10 exemplificadores que têm as sequências CDR citadas acima exibem alta homologia humana, por exemplo, são variantes humanizadas ou germinadas dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos quais derivam as sequências CDR.

[00178] Em modalidades não limitativas, os anticorpos de galectina-10 exemplificadores e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com as sequências CDR, VH e/ou VL aqui descritas podem compreender domínios CH1 e/ou domínios CL (da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente), cuja sequência de aminoácidos é total ou substancialmente humana. Para moléculas de anticorpo destinadas ao uso terapêutico humano, é típico para toda a região constante do anticorpo, ou pelo menos uma parte do mesmo, ter uma sequência de aminoácidos completa ou substancialmente humana. Portanto, um ou mais ou qualquer combinação do domínio CH1, região de dobradiça, domínio CH2, domínio CH3 e domínio CL (e domínio CH4 se presente) pode ser total ou substancialmente humano em relação à sua sequência de aminoácidos.

[00179] Vantajosamente, o domínio CH1, região de dobradiça, domínio CH2, domínio CH3 e domínio CL (e domínio CH4 se presente) podem todos ter sequência de aminoácidos completa ou substancialmente humana. No contexto da região constante de um anticorpo humanizado ou quimérico, ou fragmento de anticorpo, o termo "substancialmente humano" se refere a uma identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 90%, ou pelo menos 92%, ou pelo menos 95%, ou pelo menos 97%, ou pelo menos 99% com uma região constante humana. O termo "sequência de aminoácidos humana", neste contexto, se refere a uma sequência de aminoácidos que é codificada por um gene de imunoglobulina humana, que inclui genes da linha germinativa, rearranjados e mutados somaticamente. A invenção também contempla polipeptídeos que compreendem domínios constantes de sequência "humana" que foram alterados, por uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos em relação à sequência humana, exceto aquelas modalidades em que a presença de uma região dobradiça "totalmente humana" é expressamente exigida. Qualquer uma das modificações da região Fc exemplificadores aqui descritas pode ser incorporada nos anticorpos de galectina-10 com as sequências de domínio CDR e/ou VH/VL citadas acima. Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 com as sequências de domínio CDR e/ou VH/VL citados acima compreendem um domínio Fc de IgG humano modificado que

compreendem ou consistem nas substituições de aminoácidos H433K e N434F, em que a numeração do domínio Fc está de acordo com numeração EU. Em certas modalidades, os anticorpos de galectina-10 com as sequências de domínio CDR e/ou VH/VL citadas acima compreendem um domínio Fc IgG humano modificado que compreendem ou consistem nas substituições de aminoácidos M252Y, S254T, T256E, H433K e N434F.

[00180] A menos que indicado de outra forma no presente pedido, a porcentagem de identidade de sequência entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada comparando essas duas sequências alinhadas de uma maneira ótima e em que a sequência de aminoácidos a ser comparada pode compreender adições ou deleções em relação à sequência de referência para um alinhamento ideal entre essas duas sequências. A percentagem de identidade é calculada por meio da determinação do número de posições idênticas para as quais o resíduo de aminoácido é idêntico entre as duas sequências, da divisão desse número de posições idênticas pelo número total de posições na janela de comparação e da multiplicação do resultado obtido por 100 a fim de obter a porcentagem de identidade entre essas duas sequências. Por exemplo, é possível usar o programa BLAST, “BLAST 2 sequences” (Tatusova et al, “Blast 2 Sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponível na página da Web http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

gorf/bl2.html, os parâmetros usados são aqueles fornecidos por padrão (em particular para os parâmetros “penalidade de lacuna aberta”: 5, e “penalidade de lacuna de extensão”: 2; sendo a matriz escolhida, por exemplo, a matriz “BLOSUM 62” proposta pelo programa), sendo a percentagem de identidade entre as duas sequências a comparar calculada diretamente pelo programa.

E. Polinucleotídeos que codificam anticorpos de galectina-10

[00181] A invenção também fornece moléculas de polinucleotídeo que codificam os anticorpos de galectina-10 da invenção ou fragmentos dos mesmos. Moléculas de polinucleotídeo que codificam os anticorpos de galectina-10 de comprimento total são fornecidas, juntamente com moléculas de polinucleotídeo que codificam fragmentos, por exemplo, os domínios VH, VL e/ou VHH dos anticorpos de galectina-10 aqui descritos. Também são fornecidos vetores de expressão contendo as ditas sequências de nucleotídeos da invenção operacionalmente ligadas a sequências regulatórias que permitem a expressão dos anticorpos ou fragmentos dos mesmos em uma célula hospedeira ou sistema de expressão livre de células e uma célula hospedeira ou sistema de expressão livre de células contendo esse vetor de expressão.

[00182] As moléculas de polinucleotídeo que codificam os anticorpos de galectina-10 da invenção incluem, por

exemplo, moléculas de DNA recombinante. Os termos "ácido nucleico", "polinucleotídeo" ou uma "molécula de polinucleotídeo", como aqui usado indistintamente e se referem a qualquer molécula de DNA ou RNA, de fita simples ou dupla e, se de fita simples, a molécula de sua sequência complementar. Ao discutir as moléculas de ácido nucleico, uma sequência ou estrutura de uma molécula de ácido nucleico particular pode ser descrita neste documento de acordo com a convenção normal de fornecer a sequência na direção 5' para 3'. Em algumas modalidades da invenção, os ácidos nucleicos ou polinucleotídeos são "isolados". Esse termo, quando aplicado a uma molécula de ácido nucleico, se refere a uma molécula de ácido nucleico que é separada de sequências com as quais é imediatamente contígua no genoma de ocorrência natural do organismo no qual se originou. Por exemplo, um "ácido nucleico isolado" pode compreender uma molécula de DNA inserida em um vetor, como um plasmídeo ou vetor de vírus, ou integrado no DNA genômico de uma célula procariótica ou eucariótica ou organismo hospedeiro não humano. Quando aplicado ao RNA, o termo "polinucleotídeo isolado" se refere principalmente a uma molécula de RNA codificada por uma molécula de DNA isolada conforme definido acima. Alternativamente, o termo pode referir-se a uma molécula de RNA que foi purificada/separada de outros ácidos nucleicos com os quais estaria associada no seu estado

natural (isto é, em células ou tecidos). Um polinucleotídeo isolado (DNA ou RNA) pode ainda representar uma molécula produzida diretamente por meios biológicos ou sintéticos e separada de outros componentes presentes durante sua produção.

[00183] Para a produção recombinante de um anticorpo de galectina-10 de acordo com a invenção, um polinucleotídeo recombinante que o codifica ou polinucleotídeos recombinantes que codificam as diferentes cadeias ou domínios podem ser preparados (com o uso de técnicas de biologia molecular padrão) e inseridos em um vetor replicável para expressão em um hospedeiro escolhido célula, ou um sistema de expressão livre de células. As células hospedeiras adequadas podem ser células procariotas, de levedura ou eucariotas superiores, especificamente células de mamíferos. Exemplos de linhas de células hospedeiras de mamífero úteis são a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243 a 251 (1980)); células de mieloma de camundongo SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581;

ATCC CRL 8287) ou NS0 (coleções de cultura HPA nº 85110503); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renais caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44 a 68 (1982)); células MRC 5; células MARC FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2), bem como a linha celular PERC-6 de DSM. Os vetores de expressão adequados para uso em cada uma dessas células hospedeiras também são geralmente conhecidos na técnica.

[00184] Deve-se notar que o termo "célula hospedeira" geralmente se refere a uma linha celular cultivada. Seres humanos inteiros nos quais um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo de ligação ao antígeno de acordo com a invenção foi introduzido são explicitamente excluídos da definição de uma "célula hospedeira".

F. Produção de Anticorpo

[00185] Em um outro aspecto, a invenção também fornece um método de produção de anticorpos da invenção que compreende cultivar uma célula hospedeira (ou sistema de expressão livre de células) contendo polinucleotídeo (por

exemplo, um vetor de expressão) que codifica o anticorpo sob condições que permitem a expressão do anticorpo, e recuperar o anticorpo expresso. Esse processo de expressão recombinante pode ser usado para a produção em grande escala de anticorpos, incluindo anticorpos de galectina-10 de acordo com a invenção, incluindo anticorpos monoclonais destinados ao uso terapêutico humano. Vetores, linhas celulares e processos de produção adequados para a fabricação em grande escala de base recombinantes adequados para uso terapêutico *in vivo* estão geralmente disponíveis na técnica e serão bem conhecidos do especialista no assunto.

G. Composições Farmacêuticas

[00186] O escopo da invenção inclui composições farmacêuticas, contendo um ou uma combinação de anticorpos de galectina-10 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, formulados com um ou mais carreadores ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais) anticorpos de galectina-10. As técnicas para formular anticorpos monoclonais para uso terapêutico humano são bem conhecidas na técnica e são revistas, por exemplo, em Wang *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 96, páginas 1 a 26, 2007, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade.

[00187] Excipientes farmaceuticamente aceitáveis que

podem ser usados para formular as composições incluem, sem limitação: trocadores de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas de soro, como albumina de soro humano, substâncias tampão, como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeos parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose de sódio), polietilenoglicol, poliacrilatos, ceras, polímeros em bloco de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol e gordura de lã.

[00188] Em certas modalidades, as composições são formuladas para administração a um indivíduo por meio de qualquer via de administração adequada incluindo, sem limitação, injeção intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, epidural, nasal, oral, retal, tópica, inalatória, bucal (por exemplo, sublingual) e administração transdérmica.

H. Métodos de Tratamento

[00189] Os antagonistas de galectina-10, particularmente os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos, podem ser usados em métodos de tratamento. Assim, é fornecido aqui um antagonista

de galectina-10 de acordo com o primeiro aspecto da invenção para uso como um medicamento. Alternativamente, é fornecido aqui um antagonista de galectina-10 de acordo com o primeiro aspecto da invenção para uso em um método de tratamento. Em modalidades preferenciais, a invenção fornece anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno, conforme descrito em outro lugar neste documento, para uso como medicamentos. Alternativamente, a invenção fornece anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno conforme descrito em outro lugar neste documento para uso em um método de tratamento. Os antagonistas de galectina-10, incluindo os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, para uso como medicamentos são tipicamente formulados como composições farmacêuticas. É importante ressaltar que todas as modalidades descritas acima em relação aos antagonistas de galectina-10, particularmente os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, são igualmente aplicáveis aos métodos aqui descritos.

[00190] A presente invenção também fornece métodos de tratamento de um indivíduo em necessidade disso, em que o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de galectina-10 de acordo com o primeiro aspecto da invenção. Em modalidades preferenciais, o antagonista de galectina-10

é um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito em outro lugar neste documento. Em tais métodos de tratamento, os antagonistas de galectina-10, incluindo os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, são tipicamente formulados como composições farmacêuticas. Como aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" pretende significar a quantidade ou dose de antagonista de galectina-10, por exemplo, anticorpo, que é suficiente para produzir um efeito terapêutico, por exemplo, a quantidade ou dose de antagonista necessária para erradicar ou pelo menos aliviar os sintomas associados a uma doença ou condição. Uma quantidade ou dose apropriada pode ser determinada por um médico, conforme apropriado. Por exemplo, a dose pode ser ajustada com base em fatores como o tamanho ou peso de um indivíduo a ser tratado, a idade do indivíduo a ser tratado, a condição física geral do indivíduo a ser tratado, a condição a ser tratada, e a via de administração.

[00191] Para uso clínico, em certas modalidades, o antagonista de galectina-10 é um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito em outro lugar aqui e é administrado a um indivíduo como uma ou mais doses de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 20 mg/kg de peso corporal. Em certas modalidades, o antagonista de galectina-10 é um anticorpo de galectina-

10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito em outro lugar neste documento e é administrado a um indivíduo em uma dose de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 10 mg/kg de peso corporal. Em certas modalidades, o antagonista de galectina-10 é um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito em outro lugar neste documento e é administrado a um indivíduo em uma dose de cerca de 0,5 mg/kg de peso corporal a cerca de 10 mg/kg de peso corporal. Em certas modalidades, o antagonista de galectina-10 é um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito em outro lugar neste documento e é administrado a um indivíduo em uma dose de cerca de 1 mg/kg de peso corporal a cerca de 10 mg/kg de peso corporal.

[00192] Os antagonistas da galectina-10, particularmente os anticorpos da galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, são úteis em métodos terapêuticos, pela razão de que podem interromper a cristalização da galectina-10. Como explicado em outro lugar neste documento, os antagonistas de galectina-10 da presente invenção ligam-se a um epítopo de galectina-10, protegendo assim uma interface de empacotamento de cristal e, consequentemente, interrompendo a cristalização de galectina-10. Em certas modalidades, os antagonistas de galectina-10 inibem a cristalização de galectina-10. Em

certas modalidades, os antagonistas da galectina-10 promovem a dissolução da galectina-10 cristalina.

[00193] Os antagonistas de galectina-10, incluindo os anticorpos de galectina-10 e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser usados na prevenção ou tratamento de doenças ou condições associadas à presença ou formação de cristais de galectina-10 ou CLCs. São fornecidos aqui métodos de prevenção ou tratamento de uma doença ou condição associada com a presença ou formação de cristais de galectina-10 ou CLCs em um paciente ou indivíduo em necessidade disso por meio da administração de uma quantidade eficaz de um antagonista de galectina-10 como aqui descrito, particularmente um anticorpo galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[00194] Como aqui usado, um método de "prevenção" de uma doença ou condição significa prevenir o início da doença, prevenir o agravamento dos sintomas, prevenir a progressão da doença ou condição ou reduzir o risco de um indivíduo desenvolver a doença ou condição. Como aqui usado, um método de "tratamento" de uma doença ou condição significa curar uma doença ou condição e/ou aliviar ou erradicar os sintomas associados à doença ou condição de modo que o sofrimento do paciente seja reduzido.

[00195] Para pacientes com doenças ou condições caracterizadas pela presença de cristais de galectina-10, os

métodos de tratamento envolverão tipicamente a administração de um antagonista de galectina-10, de preferência um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, com a capacidade de dissolver a cristais de galectina-10 localizados nos tecidos do paciente. Para pacientes identificados como "em risco" de desenvolver uma doença ou condição caracterizada pela formação de cristais de galectina-10, os métodos de prevenção podem envolver a administração de um antagonista de galectina-10, de preferência um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, com capacidade de inibir a cristalização de galectina-10.

[00196] Cristais de galectina-10 ou CLCs foram observados em pacientes com uma variedade de doenças e condições. Segue-se que os antagonistas de galectina-10 aqui descritos podem ser usados para prevenir ou tratar uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: asma; rinossinusite crônica; doença celíaca; infecção por helmintos; inflamação eosinofílica gastrointestinal; fibrose cística (CF); aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA); Vasculite de Churg-Straus; pneumonia eosinofílica crônica; e leucemia mieloide aguda. Em modalidades preferenciais, os anticorpos de galectina-10 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos são usados para prevenir ou tratar uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em:

asma; rinossinusite crônica; doença celíaca; infecção por helmintos; inflamação eosinofílica gastrointestinal; fibrose cística (CF); aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA); vasculite de Churg-Straus; pneumonia eosinofílica crônica; e leucemia mieloide aguda.

[00197] Como observado acima, os cristais de galectina-10 ou CLCs estão particularmente associados a doenças ou condições caracterizadas por inflamação eosinofílica. Em modalidades preferenciais, os antagonistas de galectina-10 aqui descritos, de preferência anticorpos de galectina-10 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos aqui descritos, são usados para tratar distúrbios ou condições associadas com inflamação eosinofílica.

[00198] Em modalidades particularmente preferenciais, os antagonistas de galectina-10 aqui descritos, de preferência anticorpos de galectina-10 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos aqui descritos, são usados para prevenir ou tratar a asma.

[00199] Os resultados apresentados aqui destacam o importante papel dos CLCs na indução de uma resposta imune inata e na indução da inflamação das vias aéreas *in vivo*. Esses efeitos foram revertidos com sucesso por anticorpos galectina-10 exemplificadores aqui descritos. Verificou-se que a inflamação observada no modelo de camundongo aqui descrito é independente do complexo do inflamassoma NLRP3.

Esses resultados indicam, pela primeira vez, um papel causador para CLCs em respostas inflamatórias mediadas por meio de uma via independente do inflamassoma de NLRP3, ou seja, o complexo inflamatório previamente implicado na patologia de CLC. Segue-se que os métodos da presente invenção podem ser usados para tratar condições ou distúrbios inflamatórios, particularmente condições inflamatórias ou distúrbios das vias respiratórias. O efeito terapêutico pode ser mediado independentemente do complexo do inflamassoma NLRP3.

[00200] A presente invenção também fornece o uso de um antagonista de galectina-10 para a detecção de galectina-10 em uma amostra obtida de um paciente. Em certas modalidades, um anticorpo de galectina-10 ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a invenção é usado para detectar galectina-10 em uma amostra obtida de um paciente. Os antagonistas, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos são tipicamente usados para detectar galectina-10 cristalina. Como observado acima, cristais de galectina-10 ou cristais de CLC foram observados em pacientes com uma série de doenças e condições diferentes. Segue-se que a amostra do paciente pode ser isolada de um indivíduo com ou com suspeita de ter qualquer uma das seguintes doenças ou condições: asma, rinossinusite crônica, doença celíaca, infecção por helmintos, inflamação eosinofílica

gastrointestinal, fibrose cística (FC), broncopulmonar alérgico aspergilose (ABPA), vasculite de Churg-Straus, pneumonia eosinofílica crônica ou leucemia mieloide aguda. A detecção de galectina-10 cristalina na amostra do paciente pode ser usada para diagnosticar a doença ou condição no sujeito do qual a amostra foi obtida. A amostra pode ser qualquer amostra de paciente adequada, por exemplo, qualquer fluido ou tecido no qual CLCs são observados em um estado de doença. Em certas modalidades, a amostra é uma amostra de tecido obtida de um pólipo, por exemplo, um pólipo nasal. Em certas modalidades, a amostra é uma amostra de muco. Em tais modalidades, a detecção de galectina-10 cristalina na amostra de muco com o uso dos antagonistas da invenção pode ser usada para detectar ou diagnosticar rinossinusite crônica. Em modalidades preferidas, a amostra do paciente é uma amostra de escarro. Em tais modalidades, a detecção de galectina-10 cristalina na amostra de escarro com o uso dos antagonistas da invenção pode ser usada para detectar ou diagnosticar asma.

I. Kits

[00201] Qualquer um dos antagonistas de galectina-10, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos podem ser embalados como um kit e opcionalmente incluir instruções de uso.

Exemplos

[00202] A invenção será mais bem entendida com referência aos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1. Produção de cristais de Charcot-Leyden recombinantes (CLCs)

[00203] Estudos anteriores sobre CLCs foram realizados em cristais obtidos por autocristalização de lisados ricos em proteínas de eosinófilos de sangue humano primário ou linhas de células leucêmicas, o que levou à co-purificação de proteínas contaminantes como a lisofosfolipase (Ackerman et al. (1980); Weller et al. (1984) e Archer et al. (1965)).

[00204] Para gerar grandes quantidades de cristais de CLC puros para uso em estudos funcionais *in vivo*, a galectina-10 humana, portando uma etiqueta His-terminal N-terminal clivável, foi produzida em *E. coli* e purificada por uma combinação de cromatografia de afinidade imobilizada e tamanho - cromatografia de exclusão (**Figura 1A**). Uma sequência de DNA otimizada por códons sintéticos que codifica galectina-10 humana (resíduos 1-142, Uniprot Q05315) foi clonada nos sítios NcoI/XhoI do vetor de expressão bacteriana pET28a (Novagen, cat nº 69864-3) com uma etiqueta His e dois sítios de clivagem de protease, enteroquinase (DDDDK) e protease TEV (ENLYFQG), no terminal N (MASTTHHHHHHDTDIPTTGGGSRPDDDD-KENLYFQGHM). pET28a-galectina-10 foi transformado em células BL21 (DE3) com o

uso de canamicina (25 µg/ml) como um marcador de seleção. As culturas de expressão foram cultivadas a 28°C em meio Luria-Bertani, contendo canamicina (25 µg/ml). A expressão de galectina-10 foi induzida em uma cultura OD600 de 0,6, pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (ITPG) a uma concentração final de 1 mM, após o que a cultura foi deixada crescer durante a noite. As bactérias foram coletadas por centrifugação (6.000g por 20 min a 4°C) e a pasta celular foi armazenada a -80°C. O sedimento bacteriano foi descongelado e ressuspenso em tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,4). As células foram lisadas por sonicação em um sonificador Branson (tempo de execução total de 4 min com pulsos de 30 s a 30% de saída intercalados com 30 s de tempo de inatividade). Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 4°C (20.000 g durante 30 min). O sobrenadante foi clarificado por filtração com o uso de um filtro de topo de garrafa de 0,22 µm e carregado em uma coluna de Ni Sepharose equilibrada com NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,4. Então, a coluna foi lavada com tampão de carga suplementado com imidazol 20 mM e detergente empigen a 0,1%, seguido por lavagem com tampão de carga suplementado com imidazol 20 mM. Então, a proteína foi eluída com o uso de tampão de carga suplementado com imidazol 50 mM e 500 mM. Os picos de eluição 50 mM e 500 mM foram reunidos e concentrados e injetados em uma coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg com

o uso de PBS pH 7,4 como tampão de corrida. As frações de eluição correspondentes à galectina-10 foram reunidas e armazenadas a -80°C. Os níveis de endotoxina foram determinados com um sistema Endosafe-PTS (Charles River) como inferior a 5 EU mg^{-1} de proteína recombinante. A proteína galectina-10 marcada com His era solúvel até 30 mg/ml.

[00205] Para analisar a massa molecular e o estado oligomérico da galectina-10 marcada com His, SEC-MALLS foi realizado (**Figura 1B**). Amostras de proteína (100 µl) foram injetadas em uma coluna Superdex 200 boost 10/300 GL (GE Healthcare), com PBS pH 7,4 como tampão de corrida a 0,5 ml min^{-1}, acoplado a um detector de UV online (Shimadzu), um instrumento miniDAWN TREOS de espalhamento de luz multiangular (Wyatt) e um refratômetro Optilab T-rEX (Wyatt) a 25°C. Um incremento do índice de refração (dn/dc) de 0,185 ml g^{-1} foi usado para a concentração de proteína e determinação da massa molecular. Os dados foram analisados por meio do software ASTRA6 (Wyatt). A correção para o alargamento de banda foi aplicada com o uso de parâmetros derivados de BSA injetado em condições de execução idênticas. A análise SEC-MALLS mostrou que a galectina-10 marcada com His é um dímero em solução (**Figura 1B**). O peso molecular determinado foi de 40 ± 0,8 kDa, que se aproxima muito do peso teórico para a galectina-10 dimérica marcada de 41,2 kDa.

[00206] Para formar cristais de galectina-10 recombinante, galectina-10 marcada com N-terminal (a uma concentração entre 2 a 4,5 mg/ml) foi incubada com protease TEV produzida internamente (Kapust et al., 2001). O plasmídeo pRK793 que codifica o TEV marcado com His foi um presente gentil de David Waugh (plasmídeo Addgene nº 8827). Após digestão durante a noite, a solução de proteína foi agitada invertendo a mesma 5 vezes, após o que a solução ficou turva em cerca de 30 minutos devido à formação espontânea de cristais de CLC em forma de agulha (**Figura 1C**). Após a clivagem do TEV, a galectina-10 recombinante autocristalizou em tampão PBS e só foi solúvel até uma concentração de 0,2 mg/ml. Após digestão com TEV, três resíduos são deixados no terminal N (GHM) da galectina-10 recombinante. Os cristais se assemelhavam muito às várias formas macroscópicas originalmente descritas por Charcot e von Leyden (**Figura 1D**).

[00207] As formas de cristais de galectina-10 marcadas com fluorescência também foram produzidas. Uma vez que a galectina-10 contém dois resíduos de cisteína expostos ao solvente (Cys29 e Cys57), o corante fluorescente tiol reativo 5-iodoacetamidofluoresceína (5-IAF) foi usado para marcar fluorescentemente a galectina-10 marcada. O 5-IAF foi solubilizado em 100% de dimetilformamida até uma concentração de 100 mM. O pH da solução de proteína

galectina-10 (~ 5 mg/ml) foi ajustado para pH 8,5 por adição de Tris 100 mM pH 8,5 (com o uso de uma solução estoque de Tris 1 M pH 8,5). Em seguida, um excesso molar de 10 vezes de 5-IAF para galectina-10 (monômero) foi adicionado à solução de proteína e a reação de marcação foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 2 horas. Para galectina-10 que porta uma etiqueta de His N-terminal, foi usado um coeficiente de extinção molar de 21430 cm^{-1} M^{-1}. Em seguida, o excesso de 5-IAF não reagido foi extinto pela adição de DTT 5 mM (usando um DTT 1 M). O excesso de 5-IAF foi, então, removido executando a amostra em uma coluna de dessalinização HiTrap de 50 ml (GE Healthcare) com o uso de PBS como tampão de corrida. Em seguida, a galectina-10 marcada com 5-IAF foi concentrada e injetada na coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg. As frações do pico de eluição foram, então, reunidas e armazenadas a -80°C. Os níveis de endotoxina foram determinados com um sistema Endosafe-PTS (Charles River) como sendo inferior a 5 EU mg^{-1} de proteína recombinante. Para formar cristais fluorescentes de galectina-10, a cauda de His N-terminal da galectina-10 marcada com 5-IAF foi removida por incubação durante a noite como descrito acima. Esses cristais fluorescentes tinham as inúmeras formas originalmente descritas por Charcot (**Figura 1E**).

Exemplo 2. Caracterização de CLCs Cultivadas *in vivo*

[00208] Até à data, não houve descrição da estrutura

de rede cristalina de CLC cultivada *in vivo*. Portanto, os cristais foram isolados do muco pegajoso de pacientes com CRSwNP. O tecido da mucosa das vias aéreas e/ou secreções foram coletados de pacientes submetidos à cirurgia endoscópica dos seios da face para rinossinusite crônica com pólipos nasais (CRSwNP) (**Figura 2A**). A polipose nasal foi diagnosticada com base nos sintomas, exame clínico, endoscopia nasal e tomografia computadorizada dos seios da face, de acordo com as diretrizes do European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. Todos os pacientes se abstiveram de usar corticosteroides orais e/ou tópicos pelo menos 4 semanas antes da cirurgia. O estudo e a coleta de amostras foram aprovados pelo comitê de ética do Hospital Universitário de Ghent e um consentimento informado foi obtido de todos os pacientes antes da inclusão no estudo. Muco "tipo mucina alérgica pegajosa" obtido de pacientes foi armazenado durante a noite a 4°C em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) contendo antibióticos (50 UI/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina; Invitrogen) e BSA a 0,1% (Sigma).

[00209] Para revelar a presença e identidade dos cristais de CLC, a coloração por imunofluorescência foi realizada para galectina-10. A mucina alérgica coletada foi fixada com paraformaldeído a 4% e incluída em parafina. Lâminas de tecido (5 µm) da mucina incorporada foram

cortadas, desparafinizadas usando xyleen (3x 10 minutos) e reidratadas por imersão em etapas em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 60%, 30%, etanol a 0%, 2 minutos/etapa). Após a reidratação, as lâminas foram imersas em PBS por 5 minutos e posteriormente incubadas por 1 h com tripsina-EDTA a 0,05% (Life Technologies) a 37°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS (Life Technologies) por 10 minutos, as lâminas foram incubadas por 1 h com tampão de bloqueio (BSA a 7,5% (Sigma Aldrich) em PBS) em câmara úmida em temperatura ambiente. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C com um anticorpo antigalectina-10 humana (Clone EPR11197, Abcam, diluição 1/200 em tampão de bloqueio). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS durante 10 minutos e incubadas com um anticorpo secundário de cabra anti-coelho marcado com FITC (A11034 Life Technologies, diluição 1/400). Após lavagem por 10 minutos com PBS, as lâminas foram montadas com Vectashield contendo DAPI. As lâminas foram armazenadas no escuro e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser (Leica) no dia seguinte. Isso revelou a presença de grandes quantidades de cristais em forma de agulha imunorreativos para galectina-10 (**Figura 2B**).

[00210] Para purificar os cristais para a cristalografia *ex vivo*, o meio foi descartado e 1 g do muco foi cortado minuciosamente em 10 ml de RPMI 1640 (Sigma-

Aldrich, Bornem, Bélgica) contendo antibióticos (50 UI/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina; Invitrogen), BSA a 0,1%(Sigma) e 1 mg/ml de colágeno tipo 2 (Worthington). O muco foi ainda homogeneizado usando um Dissociador GentleMACS (Myltenyi Biotec) e subsequentemente incubado a 37°C por 45 minutos sob rotação contínua. Após a incubação, o muco parcialmente dissolvido foi homogeneizado com o Dissociador GentleMACS (Myltenyi Biotec) e centrifugado a 400 g por 7 minutos à TA. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pélete foi dissolvido em 3 ml de PBS (tecnologias Life) contendo 50 UI/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (tecnologias Life). 3 ml do fluido isolado foram misturados com 6 ml de Ficoll-Paque (GE Healthcare) e centrifugados a 250 g durante 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante e da maior parte da camada Ficoll, 2,8 ml de PBS com antibióticos foram adicionados ao fluido remanescente (200 µl) no fundo do tubo. Esse processo de precipitação foi repetido mais 5 vezes. O fluido final contendo os cristais no fundo do tubo foi ressuspenso em 2 ml de PBS com antibióticos e centrifugado a 200 g por 5 minutos. A maior parte do sobrenadante foi removido e 800 µl de PBS com antibióticos foram adicionados aos cristais nos restantes 200 µl de fluido no fundo do tubo. Cristais únicos foram coletados da solução com o uso de crioalças montadas (**Figura 2C**). Antes do congelamento instantâneo em nitrogênio

líquido, os cristais foram crioprotegidos por uma breve imersão em PBS suplementado com glicerol a 35% (em volume). Experimentos de difração a 100 K foram conduzidos na linha de luz P14 de PetraIII (DESY, Hamburgo, Alemanha). Todos os dados foram integrados e escalados com o uso do pacote XDS (Kabsch, 2010). A substituição molecular (MR) foi realizada com Phaser (McCoy et al., 2007) com o uso de modelos de pesquisa baseados na estrutura da galectina-10 (PDB 1LCL). A (re)construção do modelo foi realizada em COOT (Emsley et al., 2010) e as coordenadas individuais e o refinamento ADP foram realizados em PHENIX (Adams et al., 2010) e autoBuster (Bricogne et al., 2017). Ferramentas de validação de modelo e mapa no COOT e no pacote PHENIX foram usadas em todo o fluxo de trabalho para orientar a melhoria e validar a qualidade dos modelos cristalográficos. Com o uso dessa metodologia, a estrutura de um cristal CLC humano isolado de um paciente que sofre de pólipos nasais foi determinada com o uso de difração de raios-X de cristal único com o uso de radiação síncrotron (para resolução de 2,2 Å) (**Figura 2D, 2E, Tabela 17**). A estrutura cristalina obtida foi comparada com a dos cristais de galectina-10 recombinante (resolução de 1,4 Å) e uma estrutura publicada de cristais de galectina-10 obtida por lise de eosinófilos e cristalização *in vitro* (pdb 1LCL, 1,8 A) (Leonidas et al., 1995). A análise resultante mostrou que todas as três formas de cristal de

galectina-10 pertencem ao grupo espacial P 6522 com parâmetros de célula unitária similares (Tabela 17). Além disso, as estruturas atômicas para galectina-10 recombinante produzida em *E. coli* e para galectina-10 obtida a partir de uma linha celular eosinofílica humana (pdb 1LCL) podem ser consideradas virtualmente idênticas à estrutura da galectina-10 em cristais CLC humanos (RMSD < 0,2 Å) (**Figura 2F**).

Exemplo 3 Produção de uma variante de galectina-10 não autocristalizante, galectina-10-Tyr69Glu

[00211] A fim de produzir uma variante não autocristalizante de galectina-10, as interações de empacotamento de cristal (**Figuras 3A e 3B**) na estrutura relatada para galectina-10 (PDB 1LCL) foram analisadas. O resíduo Tyr69 que se envolve em interações de empacotamento de cristal com um resíduo de galectina-10-Tyr69 vizinho na rede cristalina foi selecionado como um resíduo-chave potencial para autocristalização (**Figura 3A**). Consequentemente, uma variante de galectina-10 com a substituição Tyr69Glu (Y69E) foi produzida de forma recombinante seguindo um protocolo idêntico àquele da galectina-10 de tipo selvagem. Para produzir uma variante de galectina-10 potencialmente não autocristalizante, o resíduo Tyr69 foi mutado para um resíduo de glutamato com o uso de mutagênese sítio-dirigida Quickchange (Agilent). Para a

mutagênese PCR foram usados os seguintes primers diretos e reversos, FP: GATGAACTCTCGTGAAGAAGGTGCATGGAAACAG (SEQ ID NO: 154) e RP:

[00212] CTGTTTCCATGCACCTTCTTCACGAGAGTTCATC (SEQ ID NO: 155). O plasmídeo pET28a-galectina-10 foi usado como molde. O plasmídeo resultante, pET28a-galectina-10-Y69E, foi usado para transformar células BL21 (DE3). A produção e purificação de proteínas foram idênticas em comparação com a galectina-10 de tipo selvagem. Após a remoção mediada por TEV da etiqueta N-terminal de galectina-10-Y69E, o TEV marcado com His foi removido executando a mistura de digestão em uma coluna de Ni-sepharose com o uso de PBS como tampão de corrida. Em seguida, o fluxo da coluna, contendo galectina-10-Y69E, foi concentrado e injetado na coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg. As frações de eluição SEC correspondentes à galectina-10-Y69E foram reunidas e armazenadas a -80°C. Os níveis de endotoxina foram determinados com um sistema Endosafe-PTS (Charles River) como inferior a 5 EU mg^{-1} de proteína recombinante. Verificou-se que após o tratamento com TEV, a muteína de galectina-10 Y69E não se autocristalizou em comparação com a galectina-10 de tipo selvagem (**Figura 3C**). De acordo com metodologia semelhante, várias outras muteínas resistentes à cristalização foram realizadas com base na importância prevista na interface de empacotamento de cristal (**Figura**

3C). A análise SEC-MALLS também mostrou que a variante Y69E é um dímero em solução. O peso molecular determinado foi de 32,6 kDa, que se aproxima do peso molecular teórico para galectina-10-Tyr69Glu dimérica clivada por TEV (33,2 kDa).

[00213] Uma estrutura cristalina da muteína de galectina-10-Y69E não autocristalizante também foi obtida. Para isso, a galectina-10-Y69E foi concentrada para 6 a 7 mg/ml antes dos experimentos de cristalização. Experimentos de cristalização de difusão de vapor em escala de nanolitro em gota assentada foram configurados a 293 K com o uso de um robô de cristalização Mosquito (TTP Labtech) e telas de matriz esparsa disponíveis comercialmente (Molecular Dimensions, Hampton research). Os cristais da muteína de galectina-10-Y69E mutante apareceram após 24 horas na condição D12 da tela de PEG/íon (Hampton Research - citrato de amônio 0,2 M pH 5,1, PEG_{3350} 20%). Antes do congelamento instantâneo em cristais de nitrogênio líquido de galectina-10-Y69E foram crioprotegidos embebendo brevemente os cristais em suplemento de licor-mãe com PEG 400 a 25%.

[00214] A análise de galectina-10-Tyr69Glu por cristalografia de raios-X mostrou que a variante não autocristalizante adota uma estrutura virtualmente idêntica à do dímero de galectina-10 cristalográfica em pdb 1LCL (RMSD <0,3 Å) (**Figuras 3D** e **F, Tabela 17**).

[00215] A estrutura da muteína solúvel em solução

também foi estudada com o uso de espalhamento de raios-X de baixo ângulo em solução (SAXS). Para isso, os dados SAXS foram medidos na linha de feixe SWING no Síncrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, França). 50 µl de galectina-10-Tyr69Glu foi injetado em uma coluna Agilent 4,6 x 300 mm Bio SEC-3 com tamanho de poro de 300 Å e HBS pH 7,4 como tampão de corrida a uma velocidade de fluxo de 0,3 ml min^{-1} a 15°C. Os dados de dispersão de raios X foram coletados em modo de fluxo contínuo com tempo de exposição de 1 s por quadro. Os dados foram registrados dentro de uma faixa de transferência de momento de 0,0066 $Å^{-1}$ <q <0,609 $Å^{-1}$, com $q = 4\pi sen\theta/\lambda$. Os dados brutos foram calculados radialmente e o buffer subtraído com o uso de Foxtrot v3.3.4 (desenvolvido em Synchrotron SOLEIL e fornecido por Xenocs, Sassenage, França). A qualidade dos dados foi analisada com Foxtrot verificando a estabilidade do raio de giração ao longo do comprimento do pico de eluição e escalando todas as curvas para o perfil de espalhamento mais intenso. A curva de espalhamento final foi obtida por meio do cálculo da média dos perfis de espalhamento sem escala e subtraídos do tampão dos quadros 255 - 268, que correspondem ao topo do pico de eluição. Os parâmetros estruturais foram determinados com o pacote ATSAS versão 2.8.3 (Franke et al., 2017). As estimativas de peso molecular foram calculadas usando DATMW por métodos baseados no volume de Porod (Petoukhov et al.,

2012), o volume de correlação (Rambo et al., 2013) e o volume aparente (Fischer et al., 2010). O perfil SAXS teórico para galectina-10-Tyr69Glu dimérico foi calculado a partir da estrutura de raios-X determinada e ajustado aos dados experimentais com o uso do servidor FoXS (Schneidman-Duhovny et al., 2016). O gráfico de diferença residual ponderada por erro foi calculado como Δ/σ = [Iexp(q) - cImod(q)]/σ(q) versus q (Trewhella et al., 2017). A análise SAXS revelou que o conjunto dimérico obtido por cristalografia de raios-X corresponde à estrutura em solução. (**Figura 3E**).

Exemplo 4. CLCs induzem uma resposta imune inata *in vivo*

[00216] Para investigar se os cristais de galectina-10 promoveram inflamação pulmonar *in vivo*, camundongos C57Bl/6 intocados (Janvier) receberam uma injeção intratraqueal de galectina-10 cristalina ou muteína de galectina-10-Tyr69Glu solúvel de controle. Para isso, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2 l/min, 2 a 3%; 05260-05, Abbott Laboratories) e, então, injetados intratracalmente (i.t.) com 100 µg de cristais de galectina-10 ou muteína de galectina-10-Tyr69Glu solúvel de controle (em 80 µl de PBS). Após 6 e 24h, os camundongos foram sacrificados por inalação de CO_2 e os pulmões foram coletados. A fim de obter suspensões de uma única célula, os pulmões foram primeiro cortados com uma tesoura e depois digeridos a 37°C por 30 min em RPMI-1640 (Thermo Fisher

Scientific) contendo Liberase™ (1:50; 05 401 127 001, Sigma-Aldrich) e DNase I (1:1000; 04 536 282 001, Sigma-Aldrich). A suspensão obtida foi filtrada através de um filtro de 70 µm e esgotada de glóbulos vermelhos por tampão de lise de RBC (NH_4Cl 0,15 M, $KHCO_3$ 1 mM, Na_2EDTA 0,1 mM em H_2O MilliQ). As suspensões de células únicas foram manchadas para citometria de fluxo. Foram usados os seguintes anticorpos: anti-CD3e FITC (145-2C11) (35-0031-U500, Tonbo Biosciences), anti-CD19 FITC (1D3) (35-0193-U500, Tonbo Biosciences), anti-CD11c FITC (HL3) (553801, BD Biosciences), anti-Siglec-F PE (552126, E50-2440) (BD Biosciences), anti-CD127 PE-CF594 (SB/199) (562419, BD Biosciences), anti-CD25 PE-Cy7 (PC61.5) (25-0251-82, ThermoFisher Scientific), anti-CD11b BD Horizon V450 (M1/70) (560455, BD Biosciences), anti-CD45 BV605 (30-F11) (563053, BD Biosciences), anti-CD90.2 APC (52-2.1) (17-0902-82, ThermoFisher Scientific), anti-Ly6G AF700 (1A8) (561236, BD Biosciences) e anti-CD117 APC-eFluor780 (2B8) (47-1171-82, ThermoFisher Scientific). As células viáveis foram discriminadas pelo uso de eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™506 (ThermoFisher Scientific). Para bloquear a ligação não específica do anticorpo, o Bloco Fc 2.4.G2 (1:600, Bioceros) foi usado. Marcadores de superfície celular foram manchadas por 30 min a 4 °C no escuro. Microesferas de Contagem 123count eBeads™ (ThermoFisher Scientific) foram adicionadas a cada amostra.

As configurações foram realizadas com o uso de Microesferas de Compensação UltraComp eBeads™ (ThermoFisher Scientific). Os dados foram coletados em um BD LSRFortessa e analisados com o software FlowJo (Tree Star Incorporation).

[00217] Após 6 h, houve um forte influxo de neutrófilos nas vias aéreas de camundongos que receberam cristais de galectina-10, mas não aqueles que receberam muteína de galectina-10-Y69E solúvel ou solução de controle de PBS (**Figura 4A**). Após 24 h, houve um forte influxo de monócitos nas vias aéreas de camundongos que receberam cristais de galectina-10, mas não aqueles que receberam muteína de galectina-10-Y69E solúvel ou solução de controle de PBS (**Figura 4A**).

[00218] A produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos que receberam cristais de galectina-10 também foi medida (**Figuras 4B e C**). A produção da quimiocina CCL-2 também foi medida (**Figura 4C**). Os camundongos foram sacrificados por uma overdose de pentobarbital e lavagem broncoalveolar (BAL) foi realizada por injeção de 1 ml de PBS contendo 0,01 mM de EDTA. Subsequentemente, o BAL foi centrifugado (400 g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Também foram produzidos lisados de tecido pulmonar. Para avaliação da secreção de citocinas, foi usado o kit Ready-Set-Go ELISA da ThermoFisher Scientific. Uma placa de meia área de 96 poços de fundo plano (Greiner) foi

revestida com 50 µl por poço de anticorpo de captura diluído em tampão de revestimento 1x (00-0000-53, ThermoFisher Scientific) e incubado durante a noite a 4°C. Os seguintes anticorpos foram usados: anticorpo de captura de IL-1β anti-camundongo (1:250; 14-7012-68A); anticorpo de captura de IL-6 anti-camundongo (1:250; 14-7061-68); anticorpo anti-TNFα de captura de camundongo (1:250; 14-7423-68), com o uso das instruções do fornecedor comercial ThermoFisher Scientific. 50 µl por poço das amostras, o padrão (padrão de IL-1β de camundongo (39-8012-60); padrão de IL-6 de camundongo (39-8061-60); padrão de TNFα de camundongo (39-8321-60), todos de ThermoFisher Scientific) e um espaço em branco foi adicionado em duplo. Após incubação e lavagem, 50 µl por poço de anticorpo de detecção (anticorpo de detecção de IL-1β anti-camundongo biotinilado (1:250; 13-7112-68A); anticorpo de detecção de IL-6 anti-camundongo biotinilado (1:250; 13-7062-68A); foi adicionado anticorpo de detecção de TNFα anti-camundongo biotinilado (1:250; 13-7341-68A) todos da ThermoFisher Scientific) diluído em diluente de ensaio 1x, seguido por outra incubação de 1 h à temperatura ambiente. Sebsequentemente, os poços foram lavados e o reagente estreptavidina-HRP (1:250; 00-4100-94, ThermoFisher Scientific) diluído no diluente de ensaio foi adicionado. Após uma incubação de 30 min à temperatura ambiente, os poços foram lavados e a solução de substrato TMB (00-4201-56,

ThermoFisher Scientific) foi adicionada. A reação foi interrompida por H_2SO_4 2,5 N e a absorvância foi lida a 450 nm com um contador Perkin Elmer Multilabel e os dados foram coletados com o software Wallac 1420 Manager. Para avaliação dos níveis de CCL-2, o kit de camundongo CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!™ da eBioscience foi usado de acordo com as instruções do fabricante (cat nº 50-112-5204).

[00219] A injeção de cristais de galectina-10 foi acompanhada pela produção de IL-6 e TNF-α a 6 h após injeção, enquanto não foi observada nenhuma indução de IL-1β nas amostras de BAL (não mostrado). A injeção de muteína de galectina-10-Y69E solúvel de controle ou PBS não levou à produção de citocinas (**Figura 4B**).

[00220] A injeção de cristais de galectina-10 também foi acompanhada pela produção de grandes quantidades de IL-1β e CCL-2 medida no tecido pulmonar (**Figura 4C**).

Exemplo 5. A resposta imune inata induzida por CLCs não é dependente do inflamassoma Nlrp3 *in vivo*

[00221] Muitos cristais inorgânicos e orgânicos têm o potencial de induzir a secreção de IL-1β a partir de células inflamatórias através do desencadeamento do inflamassoma Nlrp3, levando ao recrutamento do adaptador ASC, formação de spec ASC e ativação da caspase 1 para processamento de pró-IL-1β (Kool et al., 2011). Um artigo recente publicado no BioRxIv (bioRxiv 252957; doi:

https://doi.org/10.1101/252957) relatou que os cristais de Charcot-Leyden purificados de uma linha de células eosinofílicas humanas tinham o potencial de desencadear o inflamassoma NLRP3 *in vitro*. No entanto, não foi relatado se a inflamação induzida por cristal era dependente de NLRP3 *in vivo*, o que apontaria o inflamassoma como um alvo terapêutico. A inflamação foi estudada em 24 h como no Exemplo 4. Quando os cristais de galectina-10 foram injetados nas vias aéreas de camundongos *Nlrp3*$^{-/-}$ ou *Casp1/11*$^{-/-}$, não houve redução no influxo celular induzido por cristal em comparação com camundongos controle C57Bl/6 de ninhada do tipo selvagem (**Figura 5**). Portanto, é improvável que a inibição do inflamassoma seja bem-sucedida na inibição da inflamação induzida por CLC *in vivo*.

Exemplo 6. A resposta imune inata induzida por CLCs é independente de *Tlr4*

[00222] Os cristais de galectina-10 recombinantes são produzidos a partir da proteína galectina-10 produzida em E. coli, que tem endotoxina bacteriana em sua parede celular. Como a endotoxina pode desencadear uma resposta imune inata nos pulmões, foi importante verificar a importância potencial da contaminação dos cristais de galectina-10 com endotoxina para a indução de inflamação das vias aéreas. Por esse motivo, a resposta imune aos cristais de galectina-10 em camundongos *Tlr4*$^{-/-}$ que não têm o receptor para endotoxina

também foi estudada. A inflamação foi estudada como no Exemplo 4. Nesses camundongos, não houve redução na inflamação neutrofílica das vias aéreas induzida por cristal 24h após a injeção em comparação com camundongos C57Bl/6 de ninhada do tipo selvagem (**Figura 6**).

Exemplo 7. Os cristais de galectina-10 simulam a inflamação das vias aéreas e a síntese de IgE em camundongos humanizados recebendo PBMCs de asmáticos humanos

[00223] A galectina-10 é um neoantígeno para o sistema imunológico do camundongo, pois os camundongos não carregam o gene LGALS10 que codifica para a galectina-10. Portanto, experimentos foram realizados em camundongos humanizados portadores do sistema imunológico de um doador asmático alérgico a ácaros da poeira doméstica (HDM). Para coletar PBMCs, 50 ml de sangue de um paciente alérgico a ácaros do pó doméstico foram coletados em tubos revestidos com EDTA. O sangue foi diluído em RPMI 1640 (em volume) e espalhado sobre 12 ml de Ficoll. Após centrifugação (1.200 g, 20 min, temperatura ambiente), os PBMCs foram coletados e lavados em PBS. As células foram contadas com o uso de azul de tripano para excluir células mortas. PBMCs foram ressupensas em PBS a uma concentração de $15x10^6$ células/ml. No dia 0, camundongos NOD *Rag*$^{-/- \ -/-}$ (NRG) foram reconstituídos por injeção intraperitoneal de $3x10^6$ PBMCs. Nos dias 1-4 e 7-9, todos os camundongos foram injetados intratraquealmente com

20 µg de extrato de HDM (Greer) diluído em 50 µl de PBS. Em experimentos que abordam os efeitos pró-inflamatórios dos cristais de galectina-10, nos dias 1, 3, 7 e 9, camundongos NRG foram tratados com os seguintes regimes (**Figura 7A**): Regime 1, controle de PBS 30 µl; Regime 2, 100 µg de cristais de galectina-10 recombinante (1 µl do estoque) diluídos em 30 µl de PBS; Regime 3, 100 µg de muteína de galectina-10-Tyr69Glu recombinante (1 µl do estoque) diluída em 30 µl de PBS.

[00224] No dia 27, todos os camundongos foram desafiados uma última vez por via intratraqueal com 20 µg de extrato de HDM (Greer) diluído em 80 µl de PBS. Todos os camundongos foram sacrificados no dia 28 com o uso de uma overdose de pentobarbital injetada por via intraperitoneal. Os camundongos foram sangrados pela veia ilíaca. O sangue foi coletado em tubos secos. Esses tubos foram centrifugados (5.000 rpm por 10 minutos) para obtenção de soro. Para obter suspensões de células de pulmão único, o pulmão esquerdo foi coletado, picado com tesoura de iridectomia, homogeneizado em PBS em uma malha de 100 µm, lavado pela adição de um excesso de PBS e centrifugado a 400 g por 7 minutos. Os péletes foram ressuspensos em PBS e armazenados em gelo até uso posterior (citometria de fluxo).

[00225] Os lobos superior e inferior do pulmão direito foram fixados em PFA a 4% antes de serem incluídos em

parafina para histologia. O lobo médio do pulmão direito foi incluído em OCT e congelado a -80 graus até o uso (qRT-PCR e imunofluorescência).

[00226] Para detectar células humanas, suspensões de células únicas do pulmão esquerdo de camundongos foram incubadas por 20 minutos a 4 graus com CD45 anti-humano marcado com APC. As células mortas foram coradas usando o kit de coloração de células mortas fixáveis Aqua Live/Dead (BD). Após a lavagem das células em PBS, 15.000 microesferas de contagem foram adicionadas a cada amostra. As células foram então analisadas por citometria de fluxo em um Fortessa (BD). Nenhum dos Abs usou reação cruzada com tecidos murinos.

[00227] As concentrações de IgE humana foram medidas no soro de camundongos NRG com o uso de um kit ELISA não revestido de IgE humana (ThermoFischer). Resumidamente, as placas de ELISA foram revestidas durante a noite a 4 graus com anticorpos IgE anti-humana em tampão de revestimento. Após lavagem com um excesso de PBS-Tween 20 a 0,05%, as placas de ELISA foram bloqueadas durante 2 horas à temperatura ambiente com o tampão de bloqueio fornecido pelo fabricante. Após a lavagem, os padrões de IgE (diluição em série 1: 2), bem como os soros de camundongos NRG, foram adicionados às placas (diluição 1:5 em tampão de bloqueio) e incubados por 2 horas. O anticorpo de detecção foi adicionado durante 1 hora à temperatura ambiente. A presença

de IgE humana foi revelada pela adição de substrato TMB em todos os poços. As placas foram lidas a 450 nm em um espectrofotômetro.

[00228] Após 28 dias, o grau de influxo de células CD45+ humanas nas vias aéreas (**Figura 7B**) e a síntese de IgE humana (**Figura 7C**) foi consideravelmente maior em camundongos que receberam 4 injeções de galectina-10 cristalina em comparação com aqueles que receberam muteína galectina-10-Tyr69Glu ou aqueles que receberam PBS durante o período de desafio de HDM, mostrando que os cristais de galectina-10 aumentam o influxo celular humano nos pulmões e a síntese de IgE em um modelo de asma de camundongos imunodeficientes reconstituídos com o sistema imunológico de um doador alérgico HDM.

Exemplo 8. Produção de anticorpos de galectina-10

A. Imunização de lhamas

[00229] Duas lhamas (*llama glama*), denominadas Ynigo e Montoyo, foram imunizadas com proteínas por via intramuscular com os cristais de galectina-10 (1 mg/dose/lhama). A imunização com proteínas foi iniciada no dia 0 e os cristais de galectina-10 foram administrados a cada 14 dias para um total de três injeções (total de cinco semanas). Cinco dias após a última imunização, 400 ml de sangue dos lamas imunizados foram coletados para isolar as PBMCs e permitir a extração do RNA.

[00230] A fim de determinar a resposta imune das duas lhamas imunizados, foi usado um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para ELISA, foi usada uma forma homogênea e não cristalizada de galectina-10.

[00231] Para a realização do ELISA, uma placa Maxisorp foi revestida com galectina-10 (100 µg/ml) e bloqueada com caseína. Diluições em série de soro de lama pré e pós-imunização foram adicionadas aos poços da placa. Em seguida, a IgG1 de lhama ligada à galectina-10 revestida foi detectada com um anticorpo específico de CH1 anti-lama de camundongo (10D12), e a detecção foi realizada com um IgG-HRP anti-camundongo (DAMPO). Finalmente, após a adição de TMB, a reação foi interrompida com H_2SO_4 0,5M e a absorbância foi medida a 450 nm (Tecan Sunrise, software Magellan). Ambos os lamas imunizados mostraram uma forte resposta imunológica contra a galectina-10, embora apenas 3 injeções tenham sido realizadas.

B. Construção de biblioteca (scFv)

[00232] Bibliotecas scFv foram construídas como segue. O mRNA foi purificado a partir de PBMCs isolados do sangue das lhamas imunizados. O mRNA foi transcrito reversamente com primers hexâmeros aleatórios para obter cDNA. Para a construção de bibliotecas de cadeias pesadas e leves, foi realizada uma PCR em duas etapas. Primeiro, os primers não marcados foram usados diretamente no cDNA para

amplificar as regiões VH-CH1, VL-CL e Vk-Ck. O produto de PCR foi então purificado e usado em uma segunda PCR com os primers scFv marcados para amplificar VH, VL e Vk e esses foram clonados separadamente no vetor fagomídeo para criar as bibliotecas scFv de lhama "Lambda" e "Kappa", respectivamente. A proteína de fusão scFv consistia nas sequências VH e VL acopladas por um ligante (G4S) 3 (resíduos de glicina e serina) para um tamanho em torno de 25 kDa. A escolha de fazer bibliotecas de scFv foi baseada no fato de que os fragmentos de scFv são melhor expressos como fusões de proteína III na ponta do fago do que Fabs. Isso resulta em um melhor rendimento e diversidade da biblioteca de fago durante a seleção de exibição de fago. Porém, fragmentos de scFv tendem a formar agregados, o que pode resultar em aparentes melhores afinidades, devido ao efeito de avidez. Os fragmentos de anticorpo no formato scFv podem ser secretados no espaço periplasmático da bactéria E. coli por indução com IPTG.

[00233] O enriquecimento do fago que expressa fragmentos scFv específicos de galectina-10 foi realizado por três rodadas de seleção em galectina-10 imobilizada.

[00234] A seleção inicial dos clones scFv apropriados específicos para galectina-10 foi realizada por uma abordagem de biopreenchimento. Resumidamente, a galectina-10-HIS foi imobilizada em placas Maxisorp ELISA e, em

seguida, a biblioteca de fagos scFv (entrada) foi adicionada. Os fagos não ligados foram removidos por meio de várias etapas de lavagem. Finalmente, os fagos ligados foram eluídos com tripsina, e a infecção por E. coli foi realizada para amplificar os fagos selecionados. Esse processo resultou no enriquecimento da população de fagos que expressa scFv com antigalectina-10 de alta afinidade. No final da rodada de seleção, o número de fagos eluídos foi estimado por titulação de E. coli infectada, manchada (de 10^{-1} a 10^{-6}) em placas de Petri contendo meio LB sólido com ampicilina e glicose. A primeira rodada de seleção da biblioteca Lambda e Kappa de ambas as lhamas resultou em um enriquecimento menor de fagos antigalectina-10 específicos. Essas segunda e terceira rodadas de seleção resultaram em um enriquecimento de fagos que expressam scFv com provavelmente uma maior afinidade para galectina-10.

[00235] A partir da saída da rodada 2 (Biblioteca Kappa e Lambda versus 5 µg/ml de galectina-10) e rodada 3 (Biblioteca Kappa versus 0,2 µg/ml e Biblioteca Lambda versus 0,02 µg/ml), clones únicos foram gerados e resultaram na criação de seis placas Master. A partir dessas placas mestre, placas mestre periplasmáticas (PMP) foram produzidas. Para esse propósito, os clones individuais das placas Master foram primeiro amplificados em formato de 96 poços (poço profundo) e a produção do scFv foi induzida por uma incubação durante

a noite com IPTG. No dia seguinte, as bactérias foram lisadas por dois ciclos de congelamento/descongelamento (-80°C e -20°C). Após centrifugação, o sobrenadante (extrato periplasmático) foi coletado e transferido para placas de 96 poços separadas para ser testado quanto à capacidade de ligação (ELISA e Biacore).

C. Seleção dos extratos periplasmáticos de scFv por ELISA

[00236] Para testar a capacidade de ligação dos scFvs à galectina-10, foi estabelecido um ensaio de ligação ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida com galectina-10 solúvel (1 µg/ml), depois bloqueada com Caseína, antes de ser incubada com o extrato periplasmático (diluição 1/5 em PBS) contendo o scFv-Myc. A detecção do ligante foi realizada com um anticorpo anti-Myc-HRP. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Um número significativo de ligantes scFv de galectina-10 foi isolado após a segunda rodada de seleção (45 a 87% dos ligantes). Para ambas as lhamas, a biblioteca Lambda apresentou números mais elevados de ligantes de galectina-10 do que a biblioteca kappa. A terceira rodada de seleção resultou em um aumento no número de clones de scFv com alta capacidade de ligação à galectina-10. Os clones scFv gerados a partir da biblioteca lambda mostraram 74 a 93% de ligantes para galectina-10, enquanto o scFv gerado a partir da biblioteca kappa mostrou 15 a 20% de ligantes.

D. Sequenciamento e reformatação de clones scFv

[00237] Os clones de scFv selecionados que mostraram ligação à galectina-10 foram sequenciados. Com base em suas sequências CDR1-2-3, VH e VL, cada clone foi classificado como pertencente a uma família particular. Esse processo resultou na determinação de 65 famílias VH, 13 famílias VKappa e 23 famílias VLambda. Doze clones mostrados na Tabela 3 abaixo foram selecionados para posterior caracterização.

Tabela 3 Clones scFv ligando-se a galectina-10

Nome do clone	Isolado da rodada de seleção	Concentração Gal10 durante a seleção (ug/ml)	ligação PERI-ELISA (valores de OD)	Família VH nb	Família Lambda nb	Família Kappa nb
1A12	2	5	2,134	32	4	
2B11	2	0,5	3,793	57	1	
2C07	2	0,5	3,626	7	1	
2E11	2	0,5	3,511	23	23	
3A03	3	0,2	3,4	65		2
4B10	3	0,02	2,435	17	4	
4G05	3	0,2	3,803	18	4	
4H10	3	0,02	3,484	59	17	
5012	3	0,02	2,415	64		3
6A11	3	0,02	2,346	24	23	
6F05	3	0,2	3,827	26	17	
6F011	3	0,02	3,757	53	23	

[00238] As sequências CDR, VH e VL desses clones são mostradas nas Tabelas 14, 15 e 16 abaixo.

[00239] Os 12 clones de scFv na Tabela 3 foram reclonados como moléculas de fusão scFv-Fc humano. Para esse propósito, o DNA de cada clone scFv selecionado foi primeiro

digerido com enzimas de restrição (AscI/SfiI). Após extração do DNA do gel de agarose, a ligação do DNA foi realizada no vetor pré-digerido contendo os domínios constantes CH2-CH3 da IgG1 humana (vetor de fusão pUPEX50: pScFv-Fc). A transformação de cada produto ligado foi realizada com o uso de bactérias Top10 por choque térmico e transferência para placas de agarose LB com Ampicilina. Após uma noite de incubação, os produtos ligados mostraram um alto número de colônias bacterianas únicas, enquanto nenhuma colônia foi observada para os controles negativos (vetores vazios). Por clone de scFv, quatro a oito colônias foram coletadas e enviadas para sequenciamento. Os clones que apresentaram o inserto adequado (VH/VL) foram selecionados e amplificados para purificar a sequência de DNA (MidiPrep).

[00240] A produção em células de mamíferos foi, então, iniciada. Cada DNA do clone scFv-Fc humano foi transfectado em células HEK293E através da polietilenimina (PEI). Após 6 dias, as moléculas de scFv-Fc humano foram purificadas a partir do sobrenadante da célula usando as microesferas de proteína A sefarose. Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e a integridade das moléculas scFv-Fc humano (~100 kDa).

E. Caracterização do painel scFv-Fc humano

[00241] ELISA e SPR com um T3000 Biacore foram usados para avaliar as propriedades de ligação do painel de scFv-

Fc humano.

(i) Análise ELISA

[00242] Em uma configuração similar àquela usada durante a triagem inicial, as propriedades de ligação relativas dos 12 clones de scFv-Fc humano foram analisadas por ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida com galectina-10-His a 0,2 µg/ml e bloqueada com Caseína, antes de ser incubada com uma diluição em série das moléculas de fusão scFv-Fc humano. Após várias etapas de lavagem, a detecção do scFv-Fc humano ligado foi realizada com um anticorpo anti-Fc-HRP humano. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Finalmente, os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Os valores de EC50 de cada composto, calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta Declive variável (quatro parâmetros)). Os resultados são mostrados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 Características de ligação ELISA do painel principal de anticorpos scFv-Fc humano

Nome do clone (ScFv-hFc)	Bmax (valores de OD)	EC50 (nM)
1A12	0,409	ambíguo
2B11	2.432	0,08
2C07	2.887	0,05
2E11	1.425	0,14
3A03	1,81	0,06
4B10	1,28	0,08
4G05	3.034	0,09
4H10	1.301	0,2
5E12	1,84	0,25
6A11	1.595	0,01
6F05	2.895	0,02
6F11	1.565	0,48

Controle de isótipo	0,018	/

[00243] • Os clones 2C07, 6F05, 4G05 e 2B11 mostraram a melhor capacidade de ligação relativa com valores de EC50 entre 0,02 a 0,09 nM.

[00244] • O clone 6F11 e 5E12 mostraram a capacidade de ligação mais baixa (valores de EC50 entre 0,25 a 0,48 nM).

[00245] • Um clone (1A12) mostrou ligação fraca à galectina-10, com um ajuste ambíguo.

[00246] Além disso, todo o painel mostrou capacidade de ligação similar à galectina-10 revestida e à galectina-10-His marcada.

(ii) Análise de SPR

[00247] A fim de determinar as propriedades de ligação (taxa de associação/dissociação) do painel de scFv-Fc humano, sua capacidade de ligação à galectina-10 foi analisada em Biacore T3000. Para esse propósito, foi elaborada uma abordagem de captura. Um chip CM5 foi revestido com Fc policlonal anti-humano a 8.000 RU, em seguida, uma concentração fixa do painel de scFv-Fc humano (1,5 µg/ml), diluído em HBS-EP pH 7,4, foi capturada para atingir um sinal de ligação próximo 150 RU. Finalmente, uma diluição em série de galectina-10-His (diluição em série, 1 sobre 2 de 5 µg/ml, 6 pontos de diluição) diluída em HBS-EP pH 7,4 foi injetada.

Os dados brutos foram analisados através do software de avaliação BIA com uma subtração em branco (4-3). O kd/KD e Rmax de cada scFv-Fc humano para galectina-10-His foi determinado com o uso do Fit Kinetics simultâneo ka/kd/ Binding com transferência de massa / Local Rmax no software de avaliação BIA. Os resultados são mostrados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 Caracterização das propriedades de ligação do painel de anticorpos scFv-Fc humano em Biacore T3000

Nome do clone (ScFv-hFc)	**Rmax**	**kd 1E-04 (1/s)**	**KD (nM)**
1A12	12,4	31,5	11,7
2B11	37,3	180	0,875
2C07	41,3	2,59	0,677
2E11	21,6	111	1,16
3A03	18,3	111	1,56
4B10	20,6	128	1,94
4G05	23,6	437	0,911
4H10	19,6	27,7	1,55
5E12	6,67	17,7	4,73
6A11	35,6	1.240	0,711
6F05	38	1,17	0,918
6F11	28,84	172	2,96
Controle de isótipo	6,06	/	/

[00248] • Os clones 6F05 e 2C07 mostraram claramente a melhor afinidade (0,9 e 0,6 nM, respectivamente), com taxas de dissociação de 1,17E-04 e 2,59 E-04 s-1, respectivamente.

[00249] • No entanto, os outros 10 clones mostraram rápida taxa de dissociação com afinidades em uma faixa

nanomolar (> 17 nM).

F. Triagem dos clones scFv por tecnologia de interferometria de bio-camada (BLI) (octeto)

[00250] Além do sequenciamento e caracterização dos clones descritos nas seções D e E acima, 272 clones de scFv das placas Master 1-6, que mostraram uma ligação clara em ELISA (triagem) foram selecionados e sua capacidade de ligação a galectina-10-His foi analisado no BLI, com o uso do Octet RED96. O BLI é uma tecnologia sem etiqueta para medir as interações biomoleculares. É uma técnica analítica ótica que analisa o padrão de interferência da luz branca refletida de duas superfícies: uma camada de proteína imobilizada na ponta do biossensor e uma camada de referência interna. Qualquer mudança no número de moléculas ligadas à ponta do biossensor causa uma mudança no padrão de interferência que pode ser medida em tempo real.

[00251] Resumidamente, a galectina-10-His marcada diluída em tampão cinético foi capturada nas pontas do sensor Anti-Penta His 1K até que um nível de imobilização de 1 nm foi alcançado. Em seguida, extratos periplasmáticos diluídos (1/10) foram aplicados e a associação/dissociação à galectina-10-His imobilizada foi medida com o uso do software ForteBio Data analysis 9.0 (subtração do Tips de referência, modelo de ligação 1.1). Durante o rastreio, apenas a dissociação (taxa de dissociação) do scFv pode ser

determinada, uma vez que a concentração eficaz do scFv é desconhecida e pode variar muito de clone para clone. Os resultados confirmaram que a maioria dos clones selecionados dentro do painel de scFv apresentaram taxas de desativação rápidas. No entanto, alguns clones, principalmente da biblioteca lambda (rodada 2 e rodada 3 de seleção) mostraram taxa de dissociação lenta para galectina-10 capturada. Portanto, levando em consideração os dados de ELISA e BLI, um novo painel de scFvs principais foi selecionado.

[00252] Com base nos dados ELISA e dados BLI, um segundo painel de clones scFv principais foi levado adiante para caracterização adicional. As características desses clones scFv são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 6 Segundo painel de clones scFv principais

Nome do clone	**Isolado da rodada de seleção**	**Concentração de galectina-10 usada para seleção**	**ligação ELISA (valores de OD)**	**ligação BLI (taxa de dissociação kdis(1/s))**	**Família VH**	**Família Lambda**
1C08	2	5	3,7	8,2E-03	59	17
1C09	2	5	3,5	1,4E-03	58	4
1D011	2	5	3,3	5,2E-03	62	17
2C07	2	0,5	3,6	6,7E-03	7	1
2F09	2	0,5	3,6	9,9E-03	57	23
4E08	3	0,2	3,6	9,4E-03	56	1
6A08	3	0,02	3,5	8,2E-03	26	14
6B06	3	0,2	3,7	5,8E-03	53	23
6E10	3	0,02	3,7	1,6E-02	35	23
6F06	3	0,2	3,8	5,7E-03	14	1

[00253] As sequências CDR, VH e VL desses clones scFv

são mostradas nas Tabelas 14 a16 abaixo.

G. Reformatação de clones de scFv selecionados em uma estrutura principal de IgG1 de camundongo

[00254] As derivações selecionadas mostradas na Tabela 6 acima foram clonadas novamente em uma estrutura principal de IgG1 de camundongo para caracterização adicional. Para esse propósito, o VH e o VL de cada clone foram amplificados por PCR com o uso de primers específicos, isolados por eletroforese, purificados e digeridos com enzimas de restrição (BsmBi). Após digestão e limpeza, a ligação do DNA (VH ou VL) foi realizada em vetores pré-digeridos de BsmBi contendo os domínios constantes da cadeia leve lambda de camundongo (pUPEX116.35) ou da cadeia pesada de IgG1 de camundongo (CH1-CH2 -CH3, pUPEX116.33). A transformação de cada produto ligado foi realizada com o uso de bactérias Top10 por choque térmico e transferência para placas de agarose com Ampicilina (gene de resistência dos vetores). Após uma noite de incubação, os produtos ligados mostraram um alto número de colônias bacterianas únicas, enquanto nenhuma colônia foi observada para os controles negativos (vetores vazios). Por clone (HC e LC), quatro a oito colônias foram coletadas e enviadas para sequenciamento. Os clones que apresentaram o inserto adequado foram selecionados e amplificados para purificar a sequência de DNA (MidiPrep).

[00255] A produção de 10 IgG1 de camundongo foi realizada por transfecção com uma razão de 1 cadeia pesada para 3 cadeias leves incorporadas em células HEK293E via polietilenimina (PEI). Após 6 dias, os anticorpos monoclonais de camundongo foram purificados a partir do sobrenadante celular com o uso das microesferas de sefarose de proteína A. Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e a integridade dos anticorpos (150 kDa).

H. Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo galectina-10

[00256] Vários ensaios foram realizados para avaliar as propriedades funcionais e de ligação do painel de IgG1 de camundongo galectina-10. ELISA e SPR com um T3000 Biacore foram usados para determinar a capacidade de ligação do painel de principal.

(i) Análise ELISA

[00257] Em uma configuração similar àquela usada durante a caracterização das moléculas de scFv-Fc humano, as afinidades de ligação relativas dos 10 anticorpos IgG1 de camundongo foram analisadas por ELISA. Uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com 0,2 µg/ml de galectina-10-His. Em seguida, uma diluição em série de cada clone (de 100 nM, diluição 1/4, 12 pontos de diluições) foi incubada em galectina-10 revestida. Após várias etapas de lavagem, a

detecção da IgG1 de camundongo ligada foi realizada com um anticorpo Fc-HRP anti-camundongo. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Um controle de isotipo de IgG1 de camundongo foi usado como controle negativo. Um anticorpo policlonal antigalectina-10 foi usado como controle positivo para o revestimento de galectina-10. Os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Os valores de EC50 para cada anticorpo, calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta da curva variável (quatro parâmetros)), são relatados na tabela abaixo.

[00258] O novo painel de anticorpos IgG1 de camundongo galectina-10 mostrou uma capacidade de ligação relativa entre 3,22 nM a 0,04 nM contra galectina-10 revestida. Os clones 2F09, 6A05, 6B06 e 2C07 mostraram a melhor afinidade de ligação relativa (0,05 a 0,08 nM).

Tabela 7 Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo por ELISA

Construtos (IgG1 de camundongo)	**Bmax**	**EC50 (nM)**
1C09	2.297	0,13
1D011	1.498	0,1
2C07	2.947	0,08
2F09	3.293	0,05
4E08	2.063	3,22
6A05	1.744	0,07
6A08	3.196	0,15
6B06	3.278	0,08
6E10	2.398	0,17
6F06	2.926	0,08
Controle de isótipo	0,042	/

(ii) Análise de SPR

[00259] A capacidade de ligação dos anticorpos IgG1 de camundongo à galectina-10 foi analisada no Biacore T3000. Para esse propósito, foi elaborada uma abordagem de captura. Um chip CM5 foi revestido com Fc policlonal anti-camundongo a 8.000 RU, em seguida, uma concentração fixa do painel de anticorpo IgG1 de camundongo (1,5 µg/ml), diluído em HBS-EP pH 7,4, foi capturado para atingir um sinal de ligação em torno de 150 RU. Finalmente, uma diluição em série de galectina-10-His (diluição em série, 1 sobre 2 de 5 µg/ml) diluída em HBS-EP pH 7,4 foi injetada. Os dados brutos foram analisados através do software de avaliação BIA com uma subtração em branco (4-3). O kd/KD e Rmax de cada mAb para galectina-10-His foi determinado com o uso do Fit Kinetics simultâneo ka/kd/ Binding com transferência de massa / Local Rmax no software de avaliação BIA.

Tabela 8 Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo por Biacore T3000

Construtos (IgG1 de camundongo)	**KD (nM)**	**kd 1E-04 (1/s)**
1C09	0,5	52,9
1D11	1	52,9
2C07	0,5	3,6
2F09	0,3	3,4
4E08	0,8	8,5
6A05	0,6	48,3
6A08	1	6,7
6B06	0,3	30,6
6E10	0,5	8,2
6F06	0,7	48,7

[00260] Nessa configuração, os 10 clones mostraram

uma afinidade em um intervalo nanomolar até sub-nanomolar, com uma taxa de desaceleração entre 3,4 a 53 1^{E-04}(1/s). Em linha com os dados de ligação ELISA, os clones 2F09 e 2C07 foram encontrados no topo do painel. A taxa de dissociação medida durante a caracterização do painel de camundongo não estava em linha com a taxa de dissociação medida durante a triagem. Isso é explicado principalmente pela diferença na configuração do ensaio usada durante a triagem (BLI, galectina-10-His capturada por pontas de sensores anti-His) e a caracterização (SPR, IgG1 de camundongo capturado por Chip Fc policlonal anti-camundongo).

I. Mapeamento de epítopo do painel de IgG1 de camundongo galectina-10

[00261] Para identificar os sítios de ligação da galectina-10 dos diferentes clones, foi estabelecido um método de mapeamento de epítopos (TANDEM), com o uso da tecnologia BLI. Resumidamente, a galectina-10-His foi capturada nas pontas do sensor anti-HIS 1K, antes da incubação com um excesso de um anticorpo (chamado de anticorpo “saturante”), em seguida, transferida diretamente para uma solução contendo o anticorpo “competidor” em uma concentração subótima. Se o anticorpo “saturante” e o anticorpo competidor se ligam aos mesmos sítios de ligação, nenhuma ligação do “competidor” será detectada (expressa em desvio de nm). Se eles não compartilharem o epítopo, o

anticorpo “competidor” terá a capacidade de se ligar na presença do anticorpo “saturante”. Um controle de isótipo foi usado como um controle negativo para o anticorpo “saturante”, onde todos os clones usados como anticorpos “competidores” mostraram uma ligação clara à galectina-10.

Tabela 9 Mapeamento de epítopos por ensaio de competição

	Anticorpo 2 (competidor) a 1 ug/ml (sinal de ligação em nm)										
Anticorpo 1 (Ab Saturante) (10 ug/ml)	1C09	1D011	2F09	4E08	6A05	2C07	6A08	6B06	6E010	6F06	Tampão
1C09	0,03	0,01	0,04	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	-0,02
1D011	0,10	0,06	0,12	0,03	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	0,06	0,02
2F09	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
4E08	0,08	0,00	0,10	-0,08	-0,03	-0,05	-0,05	0,03	0,10	0,02	0,01
6A05	0,09	0,06	0,12	0,03	0,05	0,04	0,05	0,06	0,09	0,05	0,01
6A08	0,04	0,01	0,07	-0,03	0,00	-0,01	-0,04	0,02	0,04	0,00	0,01
6E010	0,02	-0,01	0,03	-0,05	-0,03	-0,04	-0,05	-0,02	0,00	-0,03	-0,21
2C07	0,03	0,02	0,05	0,00	0,01	0,03	0,05	0,04	0,06	0,03	0,02
6B06	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,03
6F06	0,04	0,03	0,06	0,01	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07	0,04	-0,05
Isótipo	1,21	1,18	1,14	0,97	1,02	0,73	1,04	0,94	1,34	1,15	-0,05
Tampão	/	/	/	/	/	0,80	1,08	0,98	1,38	1,22	/

[00262] Os resultados mostraram que os 10 clones testados competem entre si, sugerindo que se ligam ao mesmo sítio de ligação/epítopo na galectina-10-His.

[00263] Uma abordagem similar foi usada para o

primeiro painel de fusão scFv-Fc humano. Todos ligados no mesmo epítopo na galectina-10 (dados não mostrados), isto é, o mesmo epítopo que o antigalectina-10 mIgG1.

Exemplo 9. Caracterização de anticorpos de galectina-10 quanto à capacidade de afetar a cristalização *in vitro*

[00264] Os efeitos das moléculas de galectina-10 scFv-Fc humana e dos anticorpos IgG de camundongo galectina-10 na formação dos CLCs recombinantes descritos no Exemplo 1 foram testados. Como a autocristalização da galectina-10 é tão reproduzível *in vitro*, um robô de cristalização Mosquito (TTP Labtech) foi usado para rastrear anticorpos antigalectina-10 quanto ao seu potencial para bloquear a autocristalização da galectina-10. Com o uso dessa abordagem, os clones que inibiram a cristalização da galectina-10 foram rastreados. Para o ensaio de inibição de cristal, a galectina-10 recombinante de tipo selvagem clivada por TEV solúvel em PBS foi equilibrada durante a noite contra uma solução de PEG 3350 a 50% na presença de anticorpos antigalectina ou um anticorpo irrelevante. Para avaliar a inibição da formação de cristais, 250 nl de galectina-10 recombinante clivada por TEV solúvel de tipo selvagem em PBS a uma concentração de 0,4 a 0,7 mg/ml foram misturados com 100 nl de anticorpo antigalectina-10 ou um anticorpo irrelevante. Em seguida, a mistura de proteína foi equilibrada contra 40 microlitros de PEG 3350 50% (em volume)

contido no poço do reservatório de uma placa de cristalização de 96 poços. Devido à ação do PEG, a quantidade de água dentro da gota diminuiu e, portanto, a concentração de galectina-10 aumentou, até atingir o limiar onde a galectina-10 cristaliza para formar CLCs. Após a incubação durante a noite, a presença ou ausência de cristais de CLC foi avaliada com o uso de um estereomicroscópio. A presença de cristal foi determinada como 100% de formação de cristal, poucos cristais observados igual a 50% de formação de cristal e nenhum cristal observado após o tempo de incubação foi definido como 0% de formação de cristal. Esse experimento não foi qualitativo e apenas teve como objetivo classificar a potência dos diferentes clones de galectina-10 para bloquear a formação de CLC. Devido à configuração experimental e à alta concentração de moléculas de antigalectina-10 necessárias, apenas clones selecionados do scFv-Fc humano e do painel de IgG1 antigalectina-10 de camundongo foram testados.

[00265] Os cristais de CLC apareceram consistentemente em condições de controle, mas estavam ausentes em condições contendo anticorpos antigalectina-10. Essa configuração experimental é exemplificada na **Figura 8A** e a eficácia de vários clones resumidos na **Figura 8B**.

[00266] Os resultados mostram que todos os clones testados (17 no total) foram capazes de bloquear a formação

de CLC. Entre o painel de scFv-Fc humano, os clones 4B10, 2E11 e 6F5 mostraram a melhor eficácia para bloquear a aparição de CLC. O clone 1D11 mostrou a melhor potência para bloquear a formação do CLC entre o painel de IgG1 de camundongo. O clone 6A05 não mostrou formação de CLC, mesmo na razão mais baixa de galectina-10/IgG1 de camundongo antigalectina-10 e a razão para isso não é clara. No entanto, todos os controles negativos (galectina-10 incubada com scFv-Fc humano irrelevante ou IgG1 de camundongo, tampão ou BSA (2 mg/ml)) mostraram 100% de formação de CLC após 2 dias de incubação.

Exemplo 10 Anticorpos de galectina-10 podem solubilizar CLCs pré-existentes *in vitro*

[00267] Com o uso de uma configuração experimental análoga, a solubilização mediada por anticorpo de cristais de galectina-10 recombinante já formados foi avaliada com o uso das moléculas de galectina-10 scFv-Fc humana e os anticorpos IgG de camundongo galectina-10. Nesse ensaio, os anticorpos foram adicionados aos cristais que se formaram após o equilíbrio durante a noite contra a solução de PEG3350 (250 nl de galectina-10 recombinante de tipo selvagem clivado por TEV solúvel em PBS contra PEG 3350 50% durante a noite). A solubilização dos cristais foi observada em função do tempo após a adição dos anticorpos. 100 nl de antigalectina-10 ou anticorpo controle foram adicionados e a solubilização dos

cristais de galectina-10 foi observada em um estereomicroscópio. Cada condição foi realizada em 12 réplicas. Como um controle negativo, um scFv-Fc humano irrelevante e IgG1 de camundongo foram incluídos, bem como apenas tampão.

A Tabela 10 mostra que a maioria dos clones de anticorpo de galectina-10 testados tiveram a capacidade de dissolver CLCs pré-existentes. Essa dissolução ocorreu em menos de 2 horas após a incubação com as moléculas de antigalectina-10.

Nome do clone	**Formato**	**100% de Solubilização de CLC (Conc µM)**	**Nome do clone**	**Formato**	**100% de Solubilização de CLC (Conc µM)**
1A12	ScFv-Fc humano	n.t	1C09	IgG1 de camundongo	10,48
2B11	ScFv-Fc humano	5,04	1D11	IgG1 de camundongo	7,86
2C07	ScFv-Fc humano	6,86	2C07	IgG1 de camundongo	>2,2
2E11	ScFv-Fc humano	4,36	2F09	IgG1 de camundongo	10,67
3A03	ScFv-Fc humano	n.t	4E08	IgG1 de camundongo	>10
4B10	ScFv-Fc humano	6,14	6A05	IgG1 de camundongo	10,1
4G05	ScFv-Fc humano	4,36	6A08	IgG1 de camundongo	>10
4H10	ScFv-Fc humano	6	6B06	IgG1 de camundongo	>10
5E12	ScFv-Fc humano	n.t	6E10	IgG1 de camundongo	10,48
6A11	ScFv-Fc humano	n.t	6F06	IgG1 de camundongo	7,57
6F05	ScFv-Fc humano	4	6F06	IgG1 de camundongo	7,57
6F11	ScFv-Fc humano	n.t	Isótipo	IgG1 de camundongo	Sem solubilização
6F11	ScFv-Fc humano	n.t			
Isótipo	ScFv-Fc humano	Sem solubilização			

Exemplo 11 Caracterização adicional das propriedades de dissolução de cristal de anticorpos selecionados de

galectina-10

[00268] Os quatro clones mostrados na tabela abaixo foram selecionados para análise posterior.

Tabela 11 Sumário das características de 6F05, 1C09, 1D11 e 4E08

		ligação ELISA	Biacore (abordagem de captura)		Potência na inibição da formação e solubilização de CLC	
Nome do clone	Formato	EC50 (nM)	KD (nM)	kd 1E-04 (1/s)	100% de inibição da formação de CLC (Conc (µM)	100% de Solubilização de CLC (Conc µM)
6F05	scFv-Fc humano	0,02	0,9	1,2	1,00	4,00
1C09	IgG1 de camundongo	0,13	0,5	52,9	0,82	10,48
1D11	IgG1 de camundongo	0,1	1	52,9	0,34	7,86
4E08	IgG1 de camundongo	3,22	0,8	8,5	1,11	>10

A. Solubilização de lapso de tempo de CLCs por 6F05, 1C09, 1D11 e 4E08

[00269] Para melhor documentar e caracterizar o processo de solubilização de cristais de CLC por anticorpos antigalectina-10, experimentos de lapso de tempo em um microscópio confocal de disco giratório foram conduzidos. 2,5 µl de solução CLC autocristalizada (a 0,7 mg/ml) em PBS foi aplicada em um poço de uma lâmina de microscópio de câmara com fundo de vidro (Ibidi). A solubilização do cristal foi então iniciada e seguida ao longo do tempo pela adição de 2 µl de anticorpos antigalectina-10 a uma concentração de

7 mg/ml. Para evitar a evaporação, a câmara foi vedada com graxa a vácuo e uma lâmina de vidro.

[00270] A dissolução de CLC induzida por 6F05, 1C09, 1D11 e 4E08 foi monitorada. Resumidamente, a solução contendo CLCs foi aplicada em uma placa de poços de µ-lâmina, antes de ser incubada com uma concentração fixa (8 mg/ml) de um dos quatro anticorpos antigalectina-10 principais. Para cada poço, as posições de imagem foram definidas e cada posição foi fotografada a cada 3 a 5 minutos. Esses experimentos mostraram que vários anticorpos antigalectina podem solubilizar cristais CLC recombinantes em 1 a 2 horas, enquanto os anticorpos de isotipo de controle irrelevantes não podem (**Figura 9A**). Além disso, esses experimentos de lapso de tempo de alta resolução mostram que os cristais CLC diminuem de tamanho quase exclusivamente ao longo de seu eixo mais longo.

[00271] O clone 1D11 mostrou a melhor capacidade para dissolver os CLCs pré-existentes (**Figura 9B**), em que a dissolução completa foi alcançada após 1 hora. Os clones 6F05 e 4E08 mostraram capacidade de dissolução semelhante, com mais de 90% de dissolução de CLC após 90 minutos de incubação. O controle de isotipo de camundongo não mostrou nenhum efeito nos CLCs; no entanto, devido ao deslocamento dos CLCs no campo, o software interpretou mal isso como uma diminuição do espaço ocupado pelos CLCs.

B. Caracterização das propriedades de ligação de 6F05, 1C09, 1D11 e 4E08 em formato Fab

[00272] Os quatro clones de interesse foram reformatados como fragmentos Fab. Como uma primeira etapa, o VH e o VL de cada clone foram amplificados por PCR usando primers específicos, purificados por eletroforese, digeridos com enzimas de restrição (BsmBi) e ligados nos vetores pré-digeridos contendo os domínios constantes humanos: o domínio constante lambda humano para o VL (pUPEX116.9) ou o domínio constante CH1 para o VH (pUPEX86, incluindo parte da região de dobradiça). A transformação de cada um dos produtos ligados foi realizada em bactérias Top10 por choque térmico e transferidos em placa de agarose com Ampicilina (gene de resistência dos vetores). Após uma noite de incubação, os produtos ligados mostraram alto número de colônias únicas, enquanto nenhuma colônia foi observada para os controles negativos (vetores vazios). Por clones (VH e VL), quatro a oito colônias foram coletadas e enviadas para sequenciamento. Os clones que apresentaram o inserto adequado foram selecionados e amplificados para purificar a sequência de DNA (MidiPrep). A produção dos 4 clones principais foi iniciada em células de mamíferos. A transfecção foi realizada com uma razão de 1 cadeia pesada para 1 cadeia leve incorporada em células HEK293E por meio da polietilenimina (PEI). Após 10 dias de produção, os Fab

humanos foram purificados com o uso das microesferas de sepharose Capture Select IgG-CH1. Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a conformação, a pureza e a integridade das moléculas Fab (55 kDa).

[00273] As propriedades de ligação das derivações no formato Fab foram avaliadas na ligação ELISA e ligação BLI, usando um OctetRed96 de acordo com os protocolos descritos acima. Os dados de ligação ELISA (consulte a Tabela 12 abaixo) mostraram que as 4 derivações podem ser separadas em 2 grupos com base em sua capacidade de ligação à galectina-10-His revestida. Os clones 1C09 e 1D11 apresentaram a melhor capacidade de ligação relativa, com valor de EC50 entre 1,6 a 1,9 nM, enquanto os clones 4E08 e 6F5 apresentaram menor potência de ligação com afinidade entre 25,6 a 26,7 nM.

Tabela 12 Caracterização das propriedades de ligação dos 4 anticorpos principais antigalectina-10 (formato Fab) por ELISA

Construtos (Fab)	**Bmax**	**EC50 (nM)**
1C09	1,0	1,9
1D11	0,9	1,6
4E08	0,7	25,6
6F05	0,8	26,7

[00274] Os dados de ligação, obtidos com a tecnologia BLI mostraram resultados similares, com os clones 1C09 e 1D11 tendo a melhor capacidade de ligação (KD entre 10 a 13 nM, kdis entre 3 a 3,8 $^{E-03}$ (1/s)), e os clones 4E08 e 6F05 mostrando ligação mais fraca (KD entre 147 a 188 nM, kdis

entre 25 a 35 $^{E-03}$ (1/s)) - consulte a Tabela 13.

Tabela 13 Caracterização das propriedades de ligação dos 4 anticorpos principais antigalectina-10 (formato Fab) por tecnologia BLI

Construtos (Fab)	KD (nM)	kd 1E-04 (1/s)
1C09	13,4	3,83
1D11	10,7	2,99
4E08	147	24,8
6F05	188	35,6

Exemplo 12. Estrutura cristalina de fragmentos Fab de galectina-10 em complexo com galectina-10

[00275] A estrutura cristalina de diferentes fragmentos Fab em complexo com galectina-10 foi obtida, revelando como os anticorpos galectina-10 podem dissolver os cristais existentes. Para estudos estruturais, fragmentos Fab de anticorpos selecionados (1D11, 6F5, 4E8, 1C9) foram produzidos em células HEK293. Galectina-10 marcada com His recombinante a 1 mg/ml foi digerida com TEV à temperatura ambiente durante a noite com o uso de uma razão TEV:galectina-10 de 1:100. Em seguida, Fab purificado foi adicionado à galectina-10 digerida em excesso molar de 1,25. Em seguida, a mistura de proteínas foi injetada em uma coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg rodando em tampão HBS para isolar o complexo galectina-10:Fab. As frações correspondentes ao complexo galectina-10:Fab foram reunidas e armazenadas a -80°C até uso posterior. Os complexos de Galectina-10:Fab foram concentrados a 6 a 7 mg/ml antes dos

experimentos de cristalização. Experimentos de cristalização de difusão de vapor em escala de nanolitro em gota assentada foram configurados a 293 K com o uso de um robô de cristalização Mosquito (TTP Labtech) e telas de matriz esparsa disponíveis comercialmente (Molecular Dimensions, Hampton research).

[00276] Os cristais de galectina-10 complexados com Fab 1D11 cresceram durante a noite na condição B7 do ProPlex Screen (Molecular Dimensions - acetato de amônio 0,2 M, acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, PEG_{4000} a 15%). A galectina-10 complexada com Fab 6F5 cristalizou em 24 horas na condição G7 do BCS Eco Screen (Molecular Dimensions) ($CaCl_2$ 0,04 M, Na-formato 0,04 M, PIPES 0,1 M pH 7,0, PEG a 8% Smear High). Após 2 semanas, surgiram cristais de galectina-10 em complexo com Fab 4E8 na condição B7 do rastreio PEG/Ion (Hampton Research) (nitrato de amônio 0,2 M, PEG3350 a 20%).

[00277] Antes do congelamento instantâneo em cristais de nitrogênio líquido dos complexos de galectina-10:Fab foram crioprotegidos embebendo brevemente os cristais em suplemento de licor-mãe com PEG 400 a 25%. Experimentos de difração a 100 K foram conduzidos nas linhas de luz Proxima 2A do síncrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, França) e ID23-2 do ESRF (Grenoble, França). Todos os dados foram integrados e escalados com o uso do pacote XDS (Kabsch, 2010). A substituição molecular (MR) foi realizada com Phaser (McCoy

et al., 2007) com o uso de modelos de pesquisa baseados na estrutura da galectina-10 (PDB 1LCL) e uma estrutura Fab de camundongo de alta resolução (PDB 5X4G). A (re) construção do modelo foi realizada em COOT (Emsley et al., 2010) e as coordenadas individuais e o refinamento ADP foram realizados em PHENIX (Adams et al., 2010) e autoBuster (Bricogne et al., 2017). Ferramentas de validação de modelo e mapa no COOT e no pacote PHENIX foram usadas em todo o fluxo de trabalho para orientar a melhoria e validar a qualidade dos modelos cristalográficos.

[00278] A estrutura de três diferentes complexos de galectina-10:Fab foi determinada (para os anticorpos 6F5, 1D11 e 4E8) (**Figura 10A-C, Tabela 17**). Essas estruturas mostram que os diferentes anticorpos têm como alvo um epítopo na galectina-10 em torno do resíduo Tyr69 (**Figura 10 D-F**), que verificou ser o resíduo chave para o comportamento de autocristalização da galectina-10 (**Figura 3A e C**).

Exemplo 13. Anticorpos de galectina-10 solubilizam cristais de galectina-10 cultivados pelo paciente em mucina alérgica *ex vivo*

[00279] Foi estudado o potencial de clones selecionados para solubilizar cristais contidos em mucina alérgica obtida de pacientes com CRSwNP. Esses cristais estavam, portanto, em um ambiente de muco nativo e cultivados *in vivo*. As experiências de lapso de tempo para a

solubilização mediada por anticorpos de CLCs humanos em muco foram conduzidas como se segue. 4 µl de O muco contendo CLC isolado de um paciente foi manchado em um poço de uma lâmina de microscópio com fundo de vidro (Ibidi). Em seguida, 4 µl de antigalectina-10 ou anticorpo controle (a 7 mg/ml) foi adicionado ao muco manchado. Para evitar a evaporação, a câmara foi vedada com graxa a vácuo e uma lâmina de vidro. A solubilização do CLC humano foi seguida ao longo do tempo com o uso de um microscópio confocal de disco giratório. Os dados microscópicos foram analisados com o uso de Fiji. Esses experimentos de lapso de tempo são mostrados na **Figura 11**. Os CLCs humanos passam por um processo de solubilização similar aos cristais de galectina-10 recombinante, mas a solubilização demorou mais. No entanto, estava completo em 18 h de incubação da mucina alérgica com anticorpos dissolventes de cristais.

Exemplo 14. Anticorpos de galectina-10 inibem a inflamação das vias aéreas induzida por CLCs

[00280] Anticorpos de dissolução de cristal foram administrados a camundongos NRG humanizados reconstituídos com PBMCs de um indivíduo asmático alérgico HDM (Perros et al. 2009). Uma vez que os camundongos não produzem cristais de galectina-10 e a fração de PBMC não contém eosinófilos humanos (a fonte de galectina-10 endógena em humanos), os

cristais de galectina-10 foram administrados às vias aéreas de camundongos juntamente com o desafio de HDM. É extremamente difícil transferir de forma adotiva eosinófilos humanos viáveis para camundongos, razão pela qual os cristais de galectina-10 tiveram que ser administrados por via intratraqueal no momento da exposição ao alérgeno HDM. Quando os CLCs foram observados nos camundongos no dia 28 do protocolo, os mesmos sempre estiveram associados ao ácido Periódico Schiff (PAS) - muco positivo dentro das vias aéreas, assim como visto em pacientes, agregando validade à abordagem de transferência adotiva.

[00281] No dia 0, camundongos NOD *Rag*$^{-/- -/-}$ (NRG) foram reconstituídos por injeção intraperitoneal de 3x10^{6} PBMCs. Nos dias 1-4 e 7-9, todos os camundongos foram injetados intratraquealmente com 20 µg de extrato de ácaro da poeira doméstica (HDM) (Greer) diluído em 50 µl de PBS. O uso de camundongos humanizados evitou quaisquer efeitos de confusão de anticorpos murinos galectina-10 IgG1 que seriam inevitavelmente induzidos ao longo do período do protocolo de 28 dias.

[00282] Em experimentos que abordam os efeitos pró-inflamatórios dos cristais de galectina-10, nos dias 1, 3, 7 e 9 camundongos NRG foram tratados com os seguintes regimes: Regime 1, 200 µg de anticorpos de controle de isotipo intratraquealmente (diluídos em 30 µl de PBS); Regime

2, 10 µg de cristais de galectina-10 recombinante (1 µl do estoque) + 200 µg de anticorpos de controle de isotipo intratraquealmente (diluídos em 30 µl de PBS); Regime 3, 10 µg de cristais de galectina-10 recombinante (1 µl do estoque) + 200 µg de anticorpos 1D11 intratraquealmente (diluídos em 30 µl de PBS) (**Figura 12A**).

[00283] Do dia 11 em diante, os camundongos receberam injeções i.t. de 200 µg de anticorpo isotipo ou 200 µg de anticorpo 1D11 três vezes por semana até o dia do corte. No dia 27, todos os camundongos foram desafiados uma última vez por via intratraqueal com 20 µg de extrato de ácaro de poeira doméstica (Greer) diluído em 80 µl de PBS. Todos os camundongos foram sacrificados no dia 28

[00284] Após 28 dias, o grau de inflamação pulmonar (Figura 12B) foi consideravelmente maior em camundongos que receberam cristais de galectina-10 + isótipo versus isótipo sozinho durante o período de desafio de HDM. O tratamento com anticorpo 1D11 reverteu o efeito intensificador dos cristais de galectina-10 na inflamação pulmonar. Além disso, uma análise morfométrica cega do investigador (com o uso do software de análise de imagem QuPath para patologia) foi realizada para avaliar o grau de influxo de células em um perímetro de 500 µm da membrana basal das vias aéreas. Essa análise revelou um influxo acentuadamente aumentado de células inflamatórias ao redor das vias aéreas (**Figura 12E**).

[00285] O grau de síntese de IgE (**Figura 12C**) foi avaliado por ELISA (consulte o exemplo 7). Após 28 dias, a concentração sérica de IgE (**Figura 12C**) foi consideravelmente maior em camundongos que receberam cristais de galectina-10 + isótipo versus isótipo sozinho durante o período de desafio de HDM. O tratamento com anticorpo 1D11 reverteu o efeito intensificador dos cristais de galectina-10 na concentração de IgE.

[00286] A presença de metaplasia de células caliciformes, medida com o uso de níveis de mRNA de mucina MUC5AC, também foi avaliada. Para isso, o tecido pulmonar congelado foi coletado em um tubo eppendorf e foi adicionado 1 ml de Tripure. O tecido foi homogeneizado com o uso de um homogeneizador de tecido. Para extrair o RNA, 200 µl de clorofórmio foram adicionados aos tubos contendo o pulmão homogeneizado. Após um período de incubação de 5 minutos, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos. A fase transparente superior foi coletada em um eppendorf livre de RNase e foi misturada com 500 µl de isopropanol e 1 µl de glicogênio por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet contendo o RNA purificado foi lavado em etanol 75% (centrifugação a 7.500 g por 5 minutos). O sedimento foi seco ao ar por 10 minutos em temperatura ambiente e foi ressuspenso em 20 µl de água livre de RNase. Os tubos foram

colocados por 10 minutos a 60°C. A concentração de RNA foi determinada em cada amostra com o uso de um instrumento Nanodrop. 1 µg de RNA foi usado para fazer cDNA com o uso do kit de síntese de cDNA sensifast (Bioline). O RNA restante foi congelado a -80°C. O cDNA foi diluído 10 vezes em água e congelado até uso posterior. Para realizar PCR em tempo real, o seguinte mastermix foi usado para cada poço da placa de PCR: 10 µl de mistura Sensifast SYBR No-Rox, 4,75 µl de água, 5 µl de cDNA. 0,125 µl de primer direto e 0,125 µl de primer reverso (retirado de um estoque de 100 µM) foram adicionados a cada reação de PCR. Os iniciadores usados foram os seguintes: Muc5ac murino (Fwd: CTCCGTCTTAGTCAATAACCACC (SEQ ID NO: 156); Rev: GGAACTCGTTGGATTTTGGACTG (SEQ ID NO: 157)); GAPDH murino como manutenção (Fwd: ACAAAATGGTGAAGGTCGGTG (SEQ ID NO: 158); Rev: TGGCAACAATCTCCACTTTGC (SEQ ID NO: 159)).

[00287] Após 28 dias, a concentração de mRNA de Muc5AC (**Figura 12D**) foi consideravelmente maior em camundongos que receberam cristais de galectina-10 + isótipo versus isótipo sozinho durante o período de desafio de HDM. O tratamento com anticorpo 1D11 reverteu o efeito intensificador dos cristais de galectina-10 na concentração de mRNA de MUC5AC. Uma análise histológica mais detalhada revelou metaplasia de células caliciformes e produção de muco marcadamente

aumentadas, conforme visualizado pela coloração aumentada de PAS de células epiteliais pulmonares que tinham o aspecto típico de células caliciformes rico em grânulos.

[00288] A hiperreatividade brônquica (BHR) também foi avaliada no modelo de camundongo, uma vez que a BHR é uma característica essencial da asma. O efeito da administração de CLC na capacidade de resposta de camundongos ventilados mecanicamente ao broncoconstritor metacolina inalado foi avaliado usando a medição invasiva FlexiVent de resistência dinâmica (Hammad et al. 2007). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com uretano e paralisados com D-tubocurarina, traqueotomizados e intubados com cateter 18G, seguido de ventilação mecânica por aparelho Flexivent. Concentrações crescentes de metacolina (0 a 200 µg/ml) foram aerossolizadas através do cateter. A resistência dinâmica (rrs) foi registrada após uma manobra de inalação padronizada dada a cada 10 segundos por 2 minutos após a administração de metacolina. A adição de CLCs a HDM aumentou o grau de broncoconstrição em comparação com HDM sozinho e o tratamento com 1D11 neutralizou completamente esse efeito (consulte a **Figura 12F**).

Referências

1. Ackerman, S.J., D.A. Loegering, e G.J. Gleich, *The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay.* J

Immunol, 1980. **125**(5): páginas 2118 a 2126.

2. Weller, P.F., D.S. Bach e K.F. Austen, *Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase).* J Biol Chem, 1984. **259**(24): páginas 15100 a 15105.

3. Archer, G.T. e A. Blackwood, *Formation of Charcot-Leyden Crystals in Human Eosinophils and Basophils and Study of the Composition of Isolated Crystals.* J Exp Med, 1965. **122**: páginas 173 a 180.

4. Leonidas D, Elbert BL, Zhou Z-Q, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. *Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate binding family of galectins.* Structure 1995; **3**:1379 a 1393

5. Franke, D., et al., *ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions.* Journal of applied crystallography, 2017. **50**(4): páginas 1212 a 1225.

6. Petoukhov, M.V., et al., *New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis.* Journal of applied crystallography, 2012. **45**(2): páginas 342 a 350.

7. Rambo, R.P. e J.A. Tainer, *Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering.* Nature, 2013. **496**(7446): página 477.

8. Fischer, H., et al., *Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale.* Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(1): páginas 101 a 109.

9. Schneidman-Duhovny, D., et al., *FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles.* Nucleic acids research, 2016. **44**(W1): páginas W424-W429.

10. Trewhella, J., et al., *2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update.* Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2017. **73**(9).

11. Kool, M., et al., *An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma.* Immunity, 2011. **34**(4): páginas 527 a 540.

12. Perros, F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation.* Allergy, 2009. **64**(7): páginas 995 a 1002.

13. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. *Features and development of Coot.* Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010, **66**(4): páginas 486 a 501.

14. Adams, Paul D., et al. "*PHENIX: a comprehensive*

Python-based system for macromolecular structure solution.” Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 2010, **66**(2): páginas 213 a 221

15. Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vonrhein C., Womack T.O. (2017). BUSTER. Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd.

16. Hammad H., et al., *Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells.* J. Exp. Med. 2007, **204**: páginas 357 a 367

Tabela 14: Sequências de CDR de cadeia pesada de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
1D11	DYAMS	1	GISWNGGSTYYAESMKG	2	DRNLGYRLGYPYDY	3
6F05	SYAMS	4	AINSGGGSTSYADSVKG	5	PGDRLWYYRYDY	6
4E08	TSYYAWS	7	VIASDGSTYYSPSLKS	8	YIRGSSWSGWSAYDY	9
1C09	TNSYYWS	10	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	RPNWYRALDA	12
3A03	VYAMS	13	DINTSGDSTTYADSVKG	14	RYTQE	15
1A12	SYYMS	16	AINSGGGSTYYADSVKG	17	NGGIWSFGS	18
2E11	SYAMS	4	PINSGSDSASYVDSVKG	19	ARTSVVAGGMDY	20
4G05	RYWMI	21	SIYNDGGNTYYADSVKG	22	LKAAYYGMDY	23
2C07	SYAMS	4	NINSGGGSTGYADSVKG	24	YLRTYYPNAAFGMDY	25
4B10	NYWMY	26	AIDVGGGTTDYAGSVKG	27	GGSYYGGMDY	28
6A11	AYAMN	29	GVNSGGGLTSYGESVKG	30	SKRGAVVAGTGDDY	31
4H10	DYAMS	1	AISWNGGSTYYAESMKG	32	DLSASGSYYHTFGS	33
6F11	TGPYSWS	34	YIGYSGSTYYSPSLKS	35	SRSSPTTFGMDY	36
2B11	TNYYYWS	37	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	APYGISREYDY	38
5E12	NYPMT	39	AINGGGDIPYYADSVKG	40	QKWGYDPRRTDFEF	41
6A05	SYAMS	4	AINSGGGWTSYVDSVKG	42	YSGPELNTQYGMDY	43
6A08	SYAMS	4	AINRGGGSTYYADSVKG	44	PGDRLWYYRYDY	6
2F09	TNYFYWS	45	AIAYSGRTYYSPSLKS	46	GPKGLASYYDY	47
6F06	RYSMS	48	TINSGGGSTSYVDSVKG	49	SQGGISFSTQYGMDY	50
6B06	TNYYSWS	51	YIAYSGSTSYSPSLKS	52	SRSSPTTFGMDY	36
6E10	SYWMY	53	AINTGGGSTYYADSVKG	54	AGSGVAGTGYDY	55

Tabela 15: Sequências de CDR de cadeia leve de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
1D11	AGTSSDVGYGNYVS	56	EVNKRAS	57	ASYRSSNNAV	58
6F05	AGTSSDIGYGNYVS	59	KVSRRAS	60	ASYRYRNNVV	61
4E08	QGGNFGYYYGS	62	KDSERPS	63	QSADSSDNPV	64
1C09	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
3A03	KPGRTLVHTDGRTYLY	68	QVSNRGS	69	AQATYYPLT	70
1A12	QGGNFGYYYVS	71	GDSNRPS	66	LSYESSDYPV	72
2E11	QGGKFGSYYVS	73	KDNERPS	74	QSGSSSDNIV	75
4G05	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
2C07	QGGNFGRYYAS	76	RDSERPS	77	QSGRSSDNAV	78
4B10	QGAKLGRYYGI	79	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
6A11	QGGNFGRYYVS	80	KDSERPS	63	QSGSSSDNAV	81
4H10	AGTSSDVGYGDYVS	82	KVKTRAS	83	ASYKNGGTAV	84
6F11	QGGDFGRYYVA	85	QDSERPS	86	QSGISSDNIV	87
2B11	QGGKFGRYYAS	88	KDSERPS	63	QSGRSSDNAV	78
5E12	KSSQSVRIESNHKTYLN	89	DASSRES	90	QQAYAAPT	91
6A05	QGGNFGSYYAS	92	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
6A08	GLSSGSVTSSNYPG	95	NTNSRYS	96	ALNRVRGTYRV	97
2F09	QGGNFGYYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
6F06	QGGNFGRYYAN	95	KDSERPS	63	QSGSVSDNAV	96
6B06	QGGNFGRYYVS	80	QDSERPT	97	QSGTSSDNIV	98
6E10	QGGNFGYYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNAV	81

Tabela 16: Sequências VH e VL de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
1D11	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWV RQAPGKGLEWVSGISWNGGSTYYAESMKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDRNLGYRLGYPYD YWGQGTQVTVSS	99	QSVLTQPPSVSGSPGETVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPG MAPRLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEG DYYCASYRSSNNAVFGGGTHLTVL	100
6F05	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAINSGGGSTSYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATPGDRLWYYRYDYW GQGTQVTVSS	101	QAGLTQPPSVSGTLGKAVTISCAGTSSDIGYGNYVSWYQQLPG TAPKLLIYKVSRRASGVPDRFSGSKSGNTASLSISGLQSEDEA DYYCASYRYRNNVVFGGGTHLTVL	102
4E08	QVQRQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTSYYAWS WIRQPPGKGLEWMGVIASDGSTYYSPSLKSRTSISRD TSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCALYIRGSSWSGWSA YDYWGQGTQVTVSS	103	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYYGSWYQQKPGQAP VLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGGTATLTISRAQAEDEADYY CQSADSSDNPVFGGGTHLTVL	104
1C09	QVQLVESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTNSYYWS WIRQPPGKGLEWMGAIAYSGSTYYSPSLKSRTSISRD TSKNQFTLHLSSVTPEDTAVYYCARRPNWYRALDAWG QGTLVTVSS	105	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWYQQKPGQAP VQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISGAQAEDEADYY CQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	106
3A03	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSVYAMSWV RQAPGKGLEWVADINTSGDSTTYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANRYTQERGQGTQVT VSS	107	DVVLTQTPGSLSVVPGEAASISCKPGRTLVHTDGRTYLYWLQQ KPGQRPQLLIYQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAE DAGVYYCAQATYYPLTFGSGTRLEIK	108
1A12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSYYMSWV RQAPGKGLEWVSAINSGGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCVQNGGIWSFGSWGQG TQVTVSS	109	SSALTQPSAISVSLGQTARITCQGGNFGYYYVSWYQQKPGQAP VQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISGAQAEDEADYY CLSYESSDYPVFGGGTHLTVL	110

2E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSPINSGSDSASYVDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKARTSVVAGGMDYW GKGTLVTVSS	111	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGSYYVSWYQQKPGQAP VMVIYKDNERPSGIPERFSGSSSGSTSTLTISGAQAEDEGTYY CQSGSSSDNIVFGGGTELTVF	112
4G05	QLQVVESGGGLVQTGGSLTLSCTTSGFTFSRYWMIWV RQAPGKGLEWVSSIYNDGGNTYYADSVKGRFTISRDN SENTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKLKAAYYGMDYWGK GTLVTVSS	113	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWYQQKPGQAP VQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISGAQAEDEADYY CQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	114
2C07	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSNINSGGGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDMAVYYCAKYLRTYYPNAAFGM DYWGKGTLVTVSS	115	QAVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRYYASWYQQKPGQAP VLVIYRDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGRSSDNAVFGGGTHLTGL	116
4B10	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWV RQAPGKGLEWVSAIDVGGGTTDYAGSVKGRFTISRDN TKSTVYLQMNTLKPEDTALYYCLRGGSYYGGMDYWGK GTLVTVSS	117	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGAKLGRYYGIWYQQKPGQAP VQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISGAQAEDEADYY CQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	118
6A11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFGAYAMNWV RQAPGKGLEWVSGVNSGGGLTSYGESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNRLNPDDTAVYYCAKSKRGAVVAGTGDD YWGQGTQVTVSS	119	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRYYVSWYQQKPGQAP VLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGSSSDNAVFGGGTHLTVL	120
4H10	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISWNGGSTYYAESMKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKSEDAAVYYCAKDLSASGSYYHTFG SWGQGTQVTVSS	121	QAGLTQPPSVAGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGDYVSWYQHIPG TAPKLLIYKVKTRASGIPDRFSGSKSGNTASLTISGLQSGDES DYYCASYKNGGTAVFGGGTHLTVL	122
6F11	QVQRQESGPGLVKPSQTLSVTCTVSGGSITTGPYSWS WIRQPPGKGLEWIGYIGYSGSTYYSPSLKSRTSISRD TSNNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARSRSSPTTFGMDY WGKGTLVTVSS	123	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGDFGRYYVAWYTQKPGQAP VLVIYQDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEAEYY CQSGISSDNIVFGGGTHLTVL	124

2B11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTNYYYWS WIRQPPGKGLEWMGAIAYSGSTYYSPSLKSRTSISRD TSKNQFTLQLSSVTPEDTAVYYCARAPYGISREYDYW GQGTQVTVSS	125	HSAVTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGRYYASWYQQKPGQAP VLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLSISGAQAEDEADYF CQSGRSSDNAVFGGGTHLTVL	126
5E12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFRNYPMTWV RQAPGKGPEWVSAINGGGDIPYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMDSLKPEDTAMYYCAKQKWGYDPRRTDFE FRGQGTQVTVSS	127	ETVPTQSPSSVTASVGEKVTITCKSSQSVRIESNHKTYLNWYQ QRPGRGPRLLIYDASSRESGIPDRFSGSGSTSDFTLTISSVQP EDAAVYYCQQAYAAPTFGQGTKLEIK	128
6A05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAINSGGGWTSYVDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMDSLKPEDTAVYYCTKYSGPELNTQYGMD YWGKGTLVTVSS	129	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGSYYASWYQQKPGQAP VLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGSSSDNTVFGGGTHLTVL	130
6A08	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGPEWVSAINRGGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDAAVYYCATPGDRLWYYRYDYW GQGAQVTVSS	131	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPGWYQQTPG QAPRLLIYNTNSRYSGVPNRFSGSISGNKAALIISGAQPEDEA DYHCALNRVRGTYRVFGGGTHLTVL	132
2F09	QVQVQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTNYFYWS WIRQSPGKGLEWIGAIAYSGRTYYSPSLKSRTSISRD TSNNQFTLQLSSVTPEDTAVYYCARGPKGLASYYDYW GQGTQVTVSS	133	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYYVSWYQQKPGQAP VLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGSSSDNTVFGGGTHLTVL	134
6F06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSRYSMSWV RQAPGKGLEWVSTINSGGGSTSYVDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTKSQGGISFSTQYGM DYWGKGTLVTVSS	135	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRYYANWYQQKPGQAP VLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDESDYY CQSGSVSDNAVFGGGTHLAVL	136
6B06	QVQRQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTNYYSWS WIRQPPGKGLEWIGYIAYSGSTSYSPSLKSRTSISRD TSNNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARSRSSPTTFGMDY WGKGTLVTVSS	137	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRYYVSWYTQKPGQAP VLVIYQDSERPTGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGTSSDNIVFGGGTHLTVL	138

6E10	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWV RQAPGKGLEWVSAINTGGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARAGSGVAGTGYDYW GQGTQVTVSS	139	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYYVSWYQQKPGQAP VLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYY CQSGSSSDNAVFGGGTHLTVL	140

Tabela 17 Dados de raios X e estatísticas de refinamento

	Gal10 Gal10	***Cristal* de CLC *ex vivo***	**Gal10-Tyr69Glu Recombinante**	**Gal10:Fab-1D11 Recombinante**	**Gal10:Fab-6F5 Recombinante**	**Gal10:Fab-4E8 Recombinante**
Linha de feixe	P14 (PetraIII)	P14 (PetraIII)	PXIII (SLS)	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)	Proxima 2A (SOLEIL)
Ligantes	glicerol	glicerol	PG4, PG6, PGE	PG4	Ca^{2+}, PGE	/
Condições de cristalização	PBS	PBS	Sulfato de amônio 0,2 M pH 5,1 $PEG_{3350\ a\ 20\%}$	Acetato de amônio 0,2 M Acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 $PEG_{4000\ a\ 15\%}$	CaCl2 0,04 M, formato de sódio 0,04 M, PIPES 0,1 M pH 7,0 PEG a 8% Smear High	Nitrato de amônio 0,2 M $PEG_{3350\ a\ 20\%}$
crio	glicerol a 35%	glicerol a 35%	$PEG_{400\ a\ 25\%}$	$PEG_{400\ a\ 25\%}$	$PEG_{400\ a\ 25\%}$	$PEG_{400\ a\ 20\%}$
Coleta de dados						
comprimento de onda	0,9763	0,9763	0,99998	0,87313	0,87313	0,980058
Grupo de espaço	P 6522	P 6522	P 21	P 21 21 21	C 2 2 21	P 21
Dimensões de célula						

a, *b*, *c* (Å)	48,88, 48,88, 258,64	48,86, 48,86, 257,88	72,82, 93,30, 93,07	61,63, 89,22, 249,27	59,01, 146,19, 185,70	41,33, 150,45, 94,50
α, β, γ (°)	90,00, 90,00, 120,00	90,00, 90,00, 120,00	90,00, 108,94, 90,00	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 96,31, 90,00
Resolução (Å)	50,00-1,34 (1,42-1,34)	50,00-2,22 (2,35-2,22)	50,00-2,10 (2,23-2,10)	50,00-1,90 (2,02-1,90)	50,00-1,91 (2,02-1,91)	50,00-3,39 (3,60-3,39)
R_{meas}	7,6 (71,5)	30,7 (194,6)	15,4 (227,8)	23,4 (137,0)	23,6 (215,1)	21,9 (107,0)
I / σI	25,64 (5,81)	7,85 (1,29)	9,33 (0,70)	6,72 (1,30)	7,67 (1,00)	5,09 (1,05)
Completude (%)	92,4 (68,3)	99,9 (99,1)	99,0 (98,6)	99,1 (94,6)	99,7 (98,3)	98,4 (98,1)
Redundância	17,9 (14,65)	11,86 (12,20)	6,90 (6,74)	6,40 (5,99)	12,85 (11,44)	3,22 (3,33)
Fator B de Wilson	10,13	23,36	39,68	20,09	25,08	81,87
Refinamento						
Resolução (Å)	43,10-1,38	43,06-2,30	47,30-2,10	46,97-1,90	47,24-1,91	46,97-3,39
Nº de reflexões	37 604	10 056	68 227	107 597	63 022	15 645
R_{work} / R_{free}	16,81 / 17,94	18,26 / 23,54	17,24 / 20,43	17,47 / 22,34	16,61 / 20,11	31,74 / 34,44
Nº de átomos						
Proteína	1.248	1.122	6.766	8.812	4.452	8.344
Ligante/íon	6	6	112	13	11	/
Água	209	129	648	1457	835	/
B-fatores						
Proteína	15,04	28,68	50,77	26,14	38,06	133,84
Ligante/íon	25,31	53,67	70,35	65,21	71,99	/
Água	36,26	45,50	60,13	40,34	52,48	/
Desvios de R.m.s.						

Comprimentos de ligação (Å)	0,005	0,010	0,010	0,010	0,010	0,008
Ângulos de ligação (°)	0,91	1,14	1,12	1,14	1,09	1,16

Exemplo 15. Produção de anticorpos adicionais de galectina-10

[00289] Anticorpos adicionais de galectina-10 foram selecionados por bio-seleção contra galectina-10 humana e cinomolgo e selecionados por ELISA e BLI para ligação à galectina-10 (humana e cinomolgo).

[00290] As sequências das três isoformas de galectina-10 de cinomolgo (WGS, REF e YRT) são mostradas abaixo, juntamente com a sequência humana.

Humano:

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLACFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG RRVVMNSREY

WGS:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHFQVYFG NRVVMNSREF

REF:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFFNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHFQVYFG NRVVMNSREF

YRT:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIEARPLVCFFNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHFQVYFG NRVVMNSREY

GAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEAVKM VQVWRDISLTKFNVSYLKR

KIWKEEVESKNMPFQDGQEFELSILVLEDKYQVMVNGQAYYNFNHRIPVSSVKM VQVWRDISLTKFNVSN---

KIWKEEVESKNMPFQDGQEFELSILVLEDKYQVMVNGQAYYNFNHRIPVSSVKM VQVWRDISLTKFNVSN---

RTWKEEVESKNMPFQDGQEFELRILVLEDKYQVMVNGQAYYNFNHRIPVSSVKM VQVWRDISLTKFNVSN---

(WGS: SEQ ID NO: 267; REF: SEQ ID NO: 268; YRT: SEQ ID NO: 269)

[00291] A análise de sequências das isoformas humana e de 3 cinomolgo revelou o seguinte:

• As isoformas de cinomolgo galectina-10 mostram 78 a 81% de identidade com a galectina-10 humana

• As isoformas WGS e REF diferem por um único aminoácido na posição 31 (F/L)

• A isoforma YRT mostra 6 aminoácidos diferentes em comparação com a isoforma REF na posição 23 (K/E), 24 (G/R), 69 (F/Y), 70 (K/R), 71 (I/T) e 92 (S/R).

• Apenas a isoforma YRT possui um resíduo de tirosina na posição 69, como no humano.

[00292] Onze clones de scFv que mostraram ligação à galectina-10 foram sequenciados e reformatados como moléculas de fusão Fc humanas, conforme descrito no Exemplo 8.

A. Triagem do scFv por ELISA e tecnologia de interferometria de bio-camada (BLI)

(i) Análise ELISA

[00293] A capacidade de ligação do scFv (extrato

periplasmático) à galectina-10 humana e as 2 isoformas disponíveis de cinomolgo galectina-10 (WGS e REF) foram analisadas na ligação de ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com 1 µg/ml de galectina-10-His humana ou cinomolgo WGS ou isoforma REF galectina-10-His, então bloqueada com PBS 1% de Caseína, antes de ser incubada com o extrato periplasmático (diluição 1/5 em PBS 0,1% de caseína) contendo o scFv-Myc marcado. A detecção do ligante foi realizada com um anticorpo anti-Myc-HRP (Bethyl, Catálogo A190-105P). Em seguida, substrato TMB foi adicionado e a reação foi interrompida com H_2SO_4 0,5M. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Finalmente, os dados brutos (valores de OD) foram plotados com o uso de GraphPad Prism 7.01 e são mostrados na **Figura 13**. Foi determinado o número de ligantes, definido por um valor de DO superior a 0,5, por placa MP e por biblioteca. Um controle em branco e um controle negativo (ligação do extrato periplasmático de scFv ao alvo irrelevante) foram incluídos e mostraram, como esperado, nenhuma ligação.

[00294] Os resultados mostraram que um número significativo de ligações de scFv a galectina-10 humana ou cinomolgo foi isolado após a última rodada de seleção. No entanto, diferença significativa no enriquecimento de ligantes de cinomolgo humano (isoformas REF e WGS) foi

observada entre as placas mestre, com 10,6 a 87% de ligantes humanos e 0 a 92,6% de ligantes de isoformas de cinomolgo WGS & REF. Para ambas as lhamas, a biblioteca Lambda mostrou uma porcentagem claramente maior de ligação de scFv a galectina-10 humana ou cinomolgo do que a biblioteca kappa. Foi particularmente o caso da biblioteca 1K que mostrou 0 a 4% de ligantes de cinomolgo (isoformas WGS e REF). Em oposição, a biblioteca 1L e 2L mostrou 76 a 92,6% de ligantes de cinomolgo humano, indicando que a biblioteca lambda pode ser o provedor médio de ligantes de reatividade cruzada de cinomolgo humano. As placas mestre geradas a partir da condição em que a eluição de pH ácido foi aplicada (MP07 e MP08) também mostraram porcentagem relativamente alta de ligantes humanos e de cinomolgo com 0 a 60,9% de ligantes para as bibliotecas Kappa e 76,1 a 89,1% de ligantes para as bibliotecas Lambda. Como esperado e devido à sua homologia extremamente próxima, um scFv de tendência geral mostrou ligação similar ao WGS e à isoforma REF do cinomolgo galectina-10-His

Tabela 18 Pesquisa de ligação por ELISA dos extratos periplasmáticos de scFv de MP gerados após a seleção.

número MP	**Biblioteca**	**Galectina-10-His**	**Ocorrências**	**% Hits**
MP07	1K	humano	24	52,2
		cynomolgus_WGS	1	2,2
		cynomolgus_REF	0	0,0
	1L	humano	41	89,1

		cynomolgus_WGS	41	89,1
		cynomolgus_REF	41	89,1
MP08	2K	humano	5	10,9
		cynomolgus_WGS	28	60,9
		cynomolgus_REF	28	60,9
	2L	humano	35	76,1
		cynomolgus_WGS	36	78,3
		cynomolgus_REF	38	82,6
MP09	1K	humano	58	61,7
		cynomolgus_WGS	0	0,0
		cynomolgus_REF	4	4,3
MP10	1L	humano	82	87,2
		cynomolgus_WGS	87	92,6
		cynomolgus_REF	87	92,6
MP11	2L	humano	76	80,9
		cynomolgus_WGS	80	85,1
		cynomolgus_REF	79	84,0
MP12	2K	humano	10	10,6
		cynomolgus_WGS	59	62,8
		cynomolgus_REF	59	62,8

(ii) Análise BLI

[00295] Das seis placas mestras geradas durante a seleção, 321 clones que mostraram ligação humana e de cinomolgo durante a campanha de triagem de ELISA foram selecionados e sua capacidade de ligação foi testada em BLI, usando o Octet RED96. Resumidamente, isoformas WGS ou REF de humanos e cinomolgo de galectina-10-His marcada foram diluídas em tampão cinético (PBS 0,01% BSA 0,002% Tween 20) a 200 µg/ml antes de serem capturadas nas pontas do sensor Anti-Penta His 1K (ForteBio, Cat nº 18-5120) até que um nível de imobilização de 1 nm fosse alcançado. Em seguida, extratos periplasmáticos diluídos (1/5 em tampão cinético), contendo

o clone scFv, foram aplicados e a associação/dissociação à galectina-10-His imobilizada foi medida com o uso do software ForteBio Data analysis 9.0 (subtração das pontas de referência, modelo de ligação 1.1). Durante o rastreio, apenas a dissociação (taxa de dissociação) do scFv pode ser determinada, uma vez que a concentração eficaz do scFv é desconhecida e pode variar muito de clone para clone. Os resultados confirmaram que a maioria dos clones de scFv selecionados apresentam reatividade cruzada com cinomolgo humano (consulte a **Figura 14**).

B. Caracterização do painel scFv-Fc humano

[00296] ELISA e SPR com um T3000 Biacore foram usados para avaliar as propriedades de ligação do painel de scFv-Fc humano.

(i) Análise ELISA

[00297] Em uma configuração similar àquela usada durante a triagem inicial, as propriedades de ligação relativas dos 11 novos clones de scFv-Fc humano foram analisadas por ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com isoformas WGS ou YRT humanas ou de cinomolgo de galectina-10-His a 0,2 µg/ml e bloqueada com PSB 1% de Caseína, antes de ser incubada com uma diluição em série das moléculas de fusão scFv-Fc humano (a partir de 100 nM, diluição 1/5, 8 pontos de diluições). Após várias etapas de lavagem, a detecção do scFv-Fc humano ligado foi

realizada com um anticorpo anti-Fc-HRP humano (Jackson ImmunoResearch, Catálogo 109-035-008). A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Finalmente, os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Os valores de EC50 de cada clone, calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta, declive variável (quatro parâmetros)) são relatados na Tabela 19 abaixo. Como um controle positivo, o clone 6F05 do painel anterior de anticorpos galectina-10 foi incluído.

Tabela 19 Características de ligação de ELISA do painel de anticorpos scFv-Fc humano galectina-10

	humanGal10-His (0,2 µg/ml)		**cynoGal10-His_WGS (0,2 µg/ml)**		**cynoGal10-His_YRT (0,2 µg/ml)**	
Clone (scFv-Fc humano)	Bmax	EC50 (nM)	Bmax	EC50 (nM)	Bmax	EC50 (nM)
7B07	0,6	1,11	0,6	0,82	0,0	Sem ligação
7C05	1,0	0,67	1,5	ambíguo	2,1	2,53
7D10	1,5	ambíguo	2,3	ambíguo	2,3	ambíguo
7E09	2,0	1,48	2,9	1,66	2,3	1,64
8H11	2,3	0,18	3,1	0,13	3,1	0,10
10A06	1,2	0,08	2,5	0,10	3,0	0,04
10B02	2,2	0,09	3,3	0,05	3,2	0,05
10D02	1,9	0,56	3,1	1,12	2,0	1,40
10H06	1,9	0,63	2,9	0,90	2,4	0,96
11F02	1,5	0,77	2,5	ambíguo	2,5	ambíguo
11F12	1,8	0,56	3,1	0,23	3,0	0,24
6F05	2,4	0,02	0,3	ambíguo	0,3	ambíguo

[00298] A ligação do painel scFv-Fc humano a galectina-10 humana revestida e cinomolgo mostrou uma capacidade de ligação relativa variando de 0,08 a 1,48 nM em humanos e 0,04 a 2,53 nM em isoformas WGS e YRT de cinomolgo

de galectina-10. Foram realizadas as seguintes observações:

• O clone de controle positivo 6F05 mostrou a melhor capacidade de ligação relativa do painel de scFv contra o alvo humano (valor de EC50 de 0,02 nM e valor de DO de 2,4 como Bmax). No entanto, esse clone mostrou ligação fraca a ambas as isoformas de cinomolgo (ajuste ambíguo e Bmax igual a 0,3 valor de DO).

• Os clones 10A06, 10B02 e 8H11 mostraram a melhor capacidade de ligação relativa, com valores de EC50 entre 0,08 a 0,18 nM contra galectina-10 humana e 0,04 a 0,13 nM contra ambas as isoformas de galectina-10 de cinomolgo.

• Com exceção do clone 7C05, o resto do painel scFv-Fc humano mostrou perfis de ligação similares nas 2 isoformas de galectina-10 de cinomolgo.

(ii) Análise de SPR

[00299] As propriedades de ligação do painel de scFv-Fc humano à galectina-10 foram analisadas no Biacore T3000. Para esse propósito, um chip CM5 foi revestido com Fc policlonal anti-humano a 8.000 RU, então uma concentração fixa do painel scFv-Fc humano (1,5 µg/ml) foi capturada para atingir um sinal de ligação de cerca de 150 RU. Finalmente, foi injetada uma diluição em série da isoforma WGS humana ou cinomolgo de galectina-10-His (diluição em série, 1 em 2 de 5 µg/ml, 6 pontos de diluição). Os dados brutos foram analisados através do software de avaliação BIA com uma

subtração em branco (4-3). Finalmente, o kd/KD e Rmax de cada scFv-Fc humano para galectina-10-His foi determinado com o uso do Fit Kinetics simultâneo ka/kd/ Binding com transferência de massa / Local Rmax no software de avaliação BIA. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 20 Caracterização das propriedades de ligação do painel de anticorpos scFv-Fc humano galectina-10 em Biacore T3000

	Ligação Biacore (abordagem de captura) de scFv-Fc humano para							
	humanGal10-His				**cynoGal10-His_WGS**			
Nome	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)
007B07	15,0	12,4	90,0	0,8	500,0	766,0	37,0	1,5
007C05	9,9	12,4	31,0	1,3	3,8	1,4	10,0	0,4
007D10	7,9	22,2	28,0	2,8	1,8	5,8	35,0	3,2
007E09	5,4	19,0	19,0	3,5	4,9	17,4	14,0	3,6
008H11	4,53	8,2	55	1,8	17,5	16,1	41	0,9
010A06	9,1	2,5	42,0	0,3	6,6	3,5	27,0	0,5
010B02	5,0	8,1	39,0	1,6	7,7	8,0	52,0	1,0
010D02	3,4	6,6	39,0	2,0	4,5	12,2	24,0	2,7
010H06	3,2	5,6	40,0	1,8	3,4	26,2	15,0	7,8
011F02	3,7	20,3	22,0	5,4	2,4	18,5	21,0	7,9
011F12	3,2	7,2	40,0	2,3	75,4	112,0	35,0	1,5

[00300] Em linha com os dados de ligação ELISA relatados acima, o painel de fusões scFv-Fc humano mostrou diversas propriedades de ligação para a isoforma WGS humana

e de cinomolgo de galectina-10-His. Foram realizadas as seguintes observações:

• O painel de scFv-Fc humano mostrou uma afinidade entre 0,3 a 5,4 nM na galectina-10-His humana e 0,5 a 7,9 nM na isoforma cinomolgo WGS de galectina-10-His.

• Os clones 10A06, 7B07 e 7C05 mostraram a maior afinidade (0,3 nM até 1,3 nM, respectivamente), com taxas de desativação de $2,5^{E-04}$ s^{-1} até $12,4^{E-04}$ s^{-1} na galectina-10-His humana. O clone 7B07 mostrou a taxa de associação mais rápida (15^{E05} 1/Ms) e Rmax (90 RU) desse painel.

• O painel de scFv-Fc humano mostrou um Rmax 2 vezes menor em cinomolgo galectina-10-His em comparação com o alvo humano.

• Os clones 7C05, 10A06, 8H11 mostraram a maior afinidade (0,4 nM até 0,9 nM, respectivamente), com taxas de desativação de 1,4E-04 s-1 até 8E-04 s-1 na isoforma WGS de cinomolgo de galectina-10-His. O clone 7B07 mostrou a taxa de associação (500^{E05} 1/Ms) e a taxa de dissociação (766^{E-04}) mais rápidas do painel.

C. Reformatação de clones de scFv selecionados em uma estrutura principal de IgG1 de camundongo

[00301] Sete derivações selecionadas, como mostrado na tabela abaixo, foram clonadas novamente em uma estrutura de IgG1 de camundongo para posterior caracterização.

Tabela 21 Painel de clones de scFv reformatados em uma

estrutura principal de IgG1 de camundongo

			bELISA hGal10	bELISA cynoGal10-WGS	bELISA cynoGal10-YRT	Biacore em Gal10 humano			Biacore em cyno Gal10 WGS		
Clone ScFv-hFc	Família VH	Família VL	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	KD (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	KD (nM)
007B07	2	9	1,11	0,82	Sem ligação	15,0	12,4	0,8	500,0	766,0	1,5
008H11	7	10	0,18	0,13	0,10	4,53	8,2	1,8	17,5	16,1	0,9
010A06	12	34	0,08	0,10	0,04	9,1	2,5	0,3	6,6	3,5	0,5
010B02	5	26	0,09	0,05	0,05	5,0	8,1	1,6	7,7	8,0	1,0
010D02	6	17*	0,56	1,12	1,40	3,4	6,6	2,0	4,5	12,2	2,7
011F02	7b	33	0,77	10,41	ambíguo	3,7	20,3	5,4	2,4	18,5	7,9
011F12	7	16	0,56	0,23	0,24	3,2	7,2	2,3	75,4	112,0	1,5

[00302] As sequências CDR, VH e VL desses sete anticorpos são mostradas nas Tabelas 32, 33 e 34 abaixo.

[00303] Para a reformatação, as regiões VH e VL de cada clone foram amplificadas por PCR e clonadas em quadro em um vetor de expressão que codifica os domínios constantes de IgG1 de camundongo.

[00304] A produção de antigalectina-10 de IgG1 de camundongo foi realizada por transfecção com uma razão de 1 cadeia pesada para 3 cadeias leves incorporadas em células HEK293E por meio da polietilenimina (PEI). Após 6 dias de produção, os anticorpos monoclonais de camundongo foram purificados a partir do sobrenadante celular com o uso das microesferas de sefarose de proteína A. Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e a integridade dos anticorpos (MW igual a 150 kDa).

Exemplo 16. Caracterização dos anticorpos de galectina-10 em formato de IgG1 de camundongo

A. Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo galectina-10

(i) Análise ELISA

[00305] Em uma configuração similar àquela usada durante a caracterização das moléculas de scFv-Fc humano, as propriedades de ligação relativas dos 7 anticorpos IgG1 de camundongo foram analisadas por ELISA. Uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com 0,5 µg/ml de WGS humano ou cinomolgo ou isoforma YRT de galectina-10-His. Em seguida, uma diluição em série de cada clone (de 100 nM, diluição 1/4, 12 pontos de diluições) foi incubada em galectina-10 revestida. Após várias etapas de lavagem, a detecção da IgG1 de camundongo ligada foi realizada com um anticorpo Fc-HRP anti-camundongo (DAMPO, Jackson ImmunoResearch, Catálogo 715-035-150). A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Os valores de EC50 para cada anticorpo, calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta da curva variável (quatro parâmetros)), são mostrados na tabela abaixo. O anticorpo 1D11 do painel anterior foi incluído para comparação.

Tabela 22 Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo por ELISA

	humanGal10-His (0,5 µg/ml)		cynoGal10-His_WGS (0,5 µg/ml)		cynoGal10-His_YRT (0,5 µg/ml)	
Clones (IgG1 de camundongo)	**Valores de OD**	**EC50 (nM)**	**Valores de OD**	**EC50 (nM)**	**Valores de OD**	**EC50 (nM)**
1D11	2,0	0,10	0,05	n.d	0,03	n.d
7B07	0,4	0,57	3,22	0,06	0,01	n.d
8H11	1,5	1,46	3,61	0,03	2,97	0,30
10A06	0,3	0,63	3,69	0,03	3,38	0,06
10B02	1,4	2,28	3,70	0,04	3,36	0,14
10D02	2,7	3,55	3,51	0,14	2,63	ambíguo
11F02	0,9	3,08	3,29	0,60	1,70	ambíguo
11F12	2,7	4,83	3,69	0,05	3,35	0,21

[00306] Foram realizadas as seguintes observações:

• O novo painel de anticorpos IgG1 antigalectina-10 de camundongo mostrou uma capacidade de ligação relativa em ELISA entre 0,57 nM a 4,83 nM contra galectina-10 humana, 0,03 nM a 0,60 nM contra a isoforma cinomolgo WGS e 0,06 nM a 0,30 nM contra a isoforma YRT, respectivamente.

• O clone 1D11 mostrou a melhor capacidade de ligação relativa contra a galectina-10 humana (valor de EC50 0,10 nM), mas nenhuma ligação a galectina-10 cinomolgo.

• Contra a galectina-10 humana, os clones 7B07, 10A06 e 8H11 mostraram a melhor capacidade de ligação relativa com um valor de EC50 entre 0,57 nM e 1,46 nM. Contra a isoforma WGS de galectina-10, os clones 8H11, 10A06 e 10B02 foram considerados os melhores ligantes, com valores de EC50 entre 0,03 nM e 0,04 nM, 18 a 53 vezes mais potentes em comparação com o alvo humano.

• Finalmente, os clones 10A06, 10B02 e 11F12 mostraram a melhor capacidade de ligação relativa contra a isoforma YRT do cinomolgo galectina-10-His, com valores de EC50 entre

0,06 nM e 0,21 nM.

(ii) Análise de SPR

[00307] A capacidade de ligação do painel de anticorpo IgG1 de camundongo à galectina-10 foi analisada no Biacore T3000. Para esse propósito, uma abordagem de captura foi usada, em que uma concentração fixa (1,5 µg/ml) do clone de IgG1 de camundongo foi capturada por anticorpos Fc anti-camundongo policlonais imobilizados em Chip CM5 para atingir um sinal de ligação em torno de 150 RU. Então, uma diluição em série da isoforma WGS humana e cinomolgo de galectina-10-His (diluição em série, 1 sobre 2 de 5 µg/ml) diluída em HBS-EP pH 7,4 foi injetada. Os dados brutos foram analisados através do software de avaliação BIA com uma subtração em branco. O kd/KD e Rmax de cada mAbs para galectina-10-His foi determinado com o uso do Fit Kinetics simultâneo ka/kd/ Binding com transferência de massa / Local Rmax no software de avaliação BIA.

Tabela 23 Caracterização das propriedades de ligação do painel de IgG1 de camundongo por Biacore T3000

	Ligação Biacore (abordagem de captura) de IgG1 de camundongo para:							
	humanGal10-His				**cynoGal10-His_WGS**			
Clone (IgG1 de camundongo)	**ka (1/Ms) E05**	**kd (1/s) E-04**	**Rmax**	**KD (nM)**	**ka (1/Ms) E05**	**kd (1/s) E-04**	**Rmax**	**KD (nM)**
1D11	127	93,1	68	0,7	n.d	n.d	7	n.d
7B07	27,8	39	65	1,4	454	660	24	1,5
8H11	23,1	19,7	50	0,9	1,7	7,54	30	4,4
10A06	117	101	39	0,9	129	147	21	1,1
10B02	14,2	20,5	37	1,5	4,94	4,2	40	0,9
10D02	5,47	8,65	37	1,6	4,77	9,12	21	1,9
11F02	22,7	48,9	24	2,2	3,94	19,8	17	5,0

11F12	30,4	22,4	37	0,7	4,94	5,94	30	1,2

[00308] Foram realizadas as seguintes observações:

• Nessa configuração, os 7 clones de cinomolgo humano com reatividade cruzada mostraram uma afinidade em uma faixa nanomolar até sub-nanomolar contra humana e cinomolgo galectina-10 (isoforma WGS), com uma taxa de desvio variando entre $4,2x10^{-4}$ s^{-1} e $660x10^{-4}$ s^{-1}.

• Para galectina-10-His humana e cinomolgo, os clones 8H11, 10A06 e 11F12 mostraram a melhor capacidade de ligação com uma afinidade entre 0,7 nM e 0,9 nM para o alvo humano e entre 0,9 nM e 1,2 nM para o antígeno cinomolgo (isoforma WGS).

• O clone 1D11 foi considerado um dos melhores ligantes para a galectina-10 humana (afinidade igual a 0,7 nM), mas não mostrou nenhuma/baixa ligação ao antígeno cinomolgo (Rmax igual a 7 RU).

B. Dissolução de cristais CLC humanos recombinantes *in vitro*

[00309] A dissolução de CLCs induzida pelos clones de IgG1 de camundongo antigalectina-10 foi monitorada usando um microscópio confocal de disco giratório. Resumidamente, a solução contendo CLCs humanos foi colocada em uma placa de poços de lâmina µ antes de ser incubada com uma concentração fixa (50 µM) dos anticorpos IgG1 antigalectina-10 de camundongo. Finalmente, para cada poço, as posições de imagem

foram definidas e cada posição foi fotografada a cada 3 a 5 minutos por um total de 120 minutos. Finalmente, com base em um software, a superfície ocupada pelo CLC foi determinada, e a área inicial coberta pelo CLC no início do experimento foi definida como 1. Como um controle negativo, um controle de isotipo de IgG1 de camundongo foi incluído. O tamanho total do CLC foi medido ao longo do tempo e plotado no GraphPad Prism 7.01 (consulte a **Figura 15**). Os valores de EC50 e EC90 de cada clone de IgG1 de camundongo foram calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta da curva variável (quatro parâmetros)) e são relatados na tabela abaixo.

Tabela 24 Dissolução de cristais de galectina-10 *in vitro*

Concentração (μM)	**Clones**	**Formato**	**50% de dissolução (min)**	**90% de dissolução (min)**
50	1D11	mIgG1	30,1	56,7
	7B07		13,2	44,4
	8H11		22,4	43,5
	10A06		44,5	86,6
	10B02		25,1	47,4
	10D02		26,5	58,6
	11F02		25,5	57,5
	11F12		21,3	42,6

Exemplo 17. Caracterização dos anticorpos de galectina-10 em formato Fab

A. Geração dos clones Fab e dados bELISA

[00310] A fim de determinar o epítopo exato dos sete anticorpos IgG1 de camundongo galectina-10 na galectina-10,

um estudo de cristalografia foi iniciado. Para esse propósito, os sete anticorpos antigalectina-10 caracterizados no Exemplo 16 acima foram produzidos como Fabs.

[00311] Para isso, o VH e o VL de cada clone foram amplificados por PCR usando primers específicos, purificados por eletroforese, digeridos com enzimas de restrição (BsmBi) e ligados nos vetores pré-digeridos contendo os domínios constantes humanos: o domínio constante lambda humano para o VL (pUPEX116.9) ou o domínio constante CH1 para o VH (pUPEX86, incluindo parte da região de dobradiça). A transformação de cada um dos produtos ligados foi realizada em bactérias Top10 por choque térmico e as células foram transferidas para placas de agarose com Ampicilina (gene de resistência dos vetores). Após uma noite de incubação, os produtos ligados mostraram um alto número de colônias únicas, enquanto nenhuma colônia foi observada para os controles negativos (vetores vazios). Por clones (VH e VL), quatro a oito colônias foram coletadas e enviadas para sequenciamento. Os clones que apresentaram o inserto correto foram selecionados e amplificados para purificar a sequência de DNA (MidiPrep).

[00312] A produção dos sete clones principais Fab foi iniciada em células de mamíferos. A transfecção foi realizada com uma razão de 1 cadeia pesada para 3 cadeias leves

incorporadas em células HEK293E por meio da polietilenimina (PEI). Após 10 dias de produção, os Fab humanos foram purificados a partir do sobrenadante da célula com o uso das microesferas de Sepharose Capture Select IgG-CH1. Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e integridade das moléculas Fab (MW ~55 kDa).

[00313] A capacidade de ligação dos Fabs antigalectina-10 principais foi testada por ELISA de ligação. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com 1 µg/ml de galectina-10-His humana. Em seguida, uma diluição em série de cada clone (de 4 µM, diluição 1/4, 12 pontos de diluições) foi incubada em galectina-10 revestida. Após várias etapas de lavagem, a detecção do Fab ligado foi realizada com uma peroxidase específica de Fab de IgG anti-humana. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 25 Caracterização das propriedades de ligação dos Fabs de galectina-10

	bELISA em galectin-10-His revestido a 1 µg/ml	
Clone (formato de Fab)	**Bmax**	**EC50 (nM)**
1D11	1,59	1,4
7B07	0,65	24,4
8H11	0,95	24,3
10A06	0,36	89,5
10B02	0,74	61,2
10D02	1,03	16,1
11F02	0,46	81,4
11F12	1.375	22,4

[00314] Os dados de ligação de ELISA mostraram que os Fabs podem ser separados em 3 grupos com base em sua capacidade de ligação a galectina-10-His humana revestida:

• Grupo 1: Os clones 8H11, 10D02 e 11F12 foram encontrados como os melhores ligantes com a maior capacidade de ligação relativa (16 a 24 nM) e Bmax (valores de OD 0,74 a 1,3).

• Grupo 2: O clone 7B07 mostrou uma capacidade de ligação relativamente boa com um valor EC50 igual a 24 nM e capacidade de ligação máxima igual a valores de OD 0,65, mas mostrou uma inclinação lenta, sugerindo outra interação de ligação com galectina-10.

• Grupo 3: Os ligantes menos potentes com a capacidade de ligação relativa mais baixa (61 a 90 nM) e Bmax (valores de OD de 0,36 a 0,74) incluíram os clones 10B02, 10A06 e 11F02.

• Com uma capacidade de ligação relativa igual a 1,4 nM, o clone 1D11 mostrou a melhor capacidade de ligação à galectina-10 humana, consistente com os dados de mAb completos.

B. Estrutura cristalina de fragmentos Fab de galectina-10 em complexo com galectina-10

[00315] A estrutura cristalina de diferentes fragmentos Fab no complexo com galectina-10 foi obtida, conforme descrito no Exemplo 12. Os resultados são mostrados

na **Figura 16.** Essas estruturas mostram que os clones 8H11, 1D11, 4E8, 6F5, 10D2 e 11F12 se ligam à tirosina 69 (Y69), ou um epítopo na proximidade de Y69, enquanto 7B7 se liga ao lado oposto do dímero de galectina-10.

[00316] Os resíduos de galectina-10 envolvidos na ligação dos Fabs de galectina-10 ao dímero de galectina-10 são mostrados na Tabela 26 abaixo.

Tabela 26 Resíduos de galectina-10 que fazem uma interação direta com as CDRs dos Fabs de galectina-10

clone	**Resíduos de galectina-10 que interagem com**	
	VH	**VL**
1D11	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	69, 70, 71 e 73
6F5	43, 49, 68, 69, 114-117, 119-120	73, 98, 113-115 e 117
4E8	74, 113-115	49, 68, 69,73, 98, 115-117
8H11	33, 59, 60, 78-82 e 109	60, 74, 75, 77 e 79
11F12	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 e 109	74, 75, 76, 77 e 79
10B02	33, 59, 60, 77-84	74, 75, 76, 77 e 79
10D02	31, 33, 59, 60, 78-82 e 84	79
7B7	2-5, 7-11, 25, 44, 88, 123, 125, 133 e 135	2, 23, 25, 86-90, 105 e 134

[00317] Os resíduos de CDR do Fab galectina-10 envolvidos na ligação ao dímero de galectina-10 são mostrados na Tabela 27 abaixo.

Tabela 27 Resíduos de CDR dos Fabs que fazem contato com resíduos do dímero de galectina-10 na estrutura cristalina

Clone		**Resíduos de CDR Fab1**	**Resíduos de galectina-10 (Monômero A)**	**Resíduos de CDR Fab2**	**Resíduos de galectina-10 (Monômero B)**
1D11	**VH**	CDR1 - 31 CDR2 - 53 CDR3 - 102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	CDR1 - 31 CDR2 - 53 CDR3 - 102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120

	VL	CDR1 - 31 e 34 CDR3 - 93 e 97	69, 70, 71, 73	CDR1 - 31 e 34 CDR3 - 93, 96 e 97	69, 70, 71, 73
6F5	**VH**	CDR1 - 2, 27, 31 e 32 CDR3 - 98, 99, 102-105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114-117, 119-120	CDR1 - 2, 27, 31 e 32 CDR3 - 98, 99, 102-105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114-117, 119-120
	VL	CDR1 - 33 e 34 CDR2 - 51, 52, 55 e 58	73, 98, 113-115 e 117	CDR1 - 33 e 34 CDR2 - 51, 52, 55 e 58	73, 98, 113-115 e 117
4E8	**VH**	CDR2 - 60 CDR3 - 105, 107 e 109	74, 113-115	CDR2 - 60 CDR3 - 104, 105, 107 e 109	74, 113-115
	VL	CDR1 - 26, 28-31 CDR2 - 49 CDR3 - 91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117	CDR1 - 26, 28-31 CDR3 - 91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117
7B07	**VH**	CDR1 - 30 e 31 CDR2 - 53-57 CDR3 - 100, 102-105	2, 3, 25, 88 e 133	CDR1 - 30 e 31 CDR2 - 53-57 CDR3 - 100, 102-104	4, 5, 7-11, 44, 123, 125, 135
	VL	CDR1 - 26, 28-31 CDR2 - 48, 50, 51 CDR3 - 65, 91-93	2, 23, 25, 86-90, 105 e 134	CDR1 - 26, 28-31 CDR2 - 48, 50, 51 CDR3 - 65, 91-93	2, 23, 25, 86-90, 105, 134
8H11	**VH**	CDR1 - 31-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 e 59 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 78-82 e 109	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 e 59 CDR3 - 100 e 101	33, 59, 60, 78-82 e 109
	VL	CDR1 - 31, 32 e 34 CDR3 - 93 e 97	60, 74, 75, 77 e 79	CDR1 - 31, 32 e 34 CDR3 - 93 e 97	60, 74, 75, 77 e 79
11F12	**VH**	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 56 e 57 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 e 109	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 57 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 78-82 e 109
	VL	CDR1 32 e 34 CDR3 97	74, 75, 76, 77 e 79	CDR1 - 32 e 34 CDR3 - 97	74, 75, 77 e 79,
10B02	**VH**	CDR1 - 31-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 e 59 CDR3 - 99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84	CDR1 - 31 e 33 CDR2 - 53-54, 56, 57 e 59 CDR3 - 99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84
	VL	CDR1 - 31, 32 e 34 CDR3 - 93 e 97	74, 75, 76, 77 e 79	CDR1 -30, 31, 32 e 34 CDR3 - 93 e 97	74, 75, 76, 77 e 79
10D02	**VH**	CDR1 - 28, 30-33	31, 33, 59,	CDR1 - 28,	31, 33, 59,

		CDR2 - 53-57 CDR3 - 99-101	60, 70, 72, 78-82, 84,	30-33 CDR2 - 52-54, 56 e 57 CDR3 - 99-103	60, 70, 72, 78-82, 84,
	VL	CDR3 - 97	79	CDR3 - 97	2, 79

Exemplo 18. Comparação da dissolução de CLC por galectina-10 mAbs e fragmentos Fab

[00318] A capacidade dos Fabs de galectina-10 para solubilizar cristais de galectina-10 humana recombinante pré-existente *in vitro* foi comparada com os mAbs de galectina-10. O protocolo foi conforme descrito no Exemplo 16 acima.

[00319] Os resultados são apresentados na **Figura 17** e também na tabela a seguir. Em alguns casos, os fragmentos Fab foram mais eficazes na dissolução dos CLCs do que os mAbs correspondentes.

Tabela 28 Dissolução de CLC mediada por galectina-10 mAbs e Fabs

Concentração (µM)	**Clones**	**Formato**	**50% de dissolução de cristal (min)**	**90% de dissolução de cristal (min)**
50	7B07	mIgG1	31,76	93,02
	8H11		68,29	>120
	10A06		>120	>120
	10B02		73,66	>120
	11F12		65,43	>120
	1D11		100	>120
50	7B07	hFab	15,09	54,14
	8H11		48,53	>120
	10A06		49,15	>120
	10B02		102,2	>120
	10D02		59,67	>120
	11F02		77,86	>120

	11F12		61,96	>120
	1D11		33,42	97,85

Exemplo 19. Produção de anticorpos VHH que se ligam a galectina-10

[00320] Duas lhamas foram imunizados com galectina-10 humana recombinante. O RNA mensageiro (mRNA) foi purificado a partir de PBMCs isolados do sangue das lhamas imunizadas. O mRNA foi transcrito reversamente com primers hexâmeros aleatórios para obter cDNA. Primers marcados foram usados diretamente no cDNA para amplificar por PCR a região VHH. O produto de PCR foi então purificado, digerido e clonado no vetor fagomídeo (marcado com VHH-Myc-His) para criar uma biblioteca VHH.

[00321] Para selecionar clones VHH com a capacidade de ligação apropriada para galectina-10 humana e cinomolgo, uma abordagem de biopreenchimento foi usada. Para esse propósito, foi realizada a primeira rodada de seleção contra galectina-10-His humana, seguida de uma segunda rodada de enriquecimento contra isoformas WGS ou YRT humanas ou cinomolgo (etiqueta His). Resumidamente, galectina-10-His humana ou cinomolgo (isoforma WGS ou YRT) foi imobilizada na placa Maxisorp ELISA e, então, foi adicionada a biblioteca de fagos VHH (entrada). Os fagos não ligados foram removidos por meio de várias etapas de lavagem. Finalmente, a infecção

por E. coli foi realizada a fim de amplificar os fagos selecionados. Esse processo resultou no enriquecimento da população de fagos que expressa VHH com alta afinidade contra galectina-10 humana e cinomolgo.

[00322] A partir dos fagos eluídos da rodada 2, versus 0,5 e 0,05 µg/ml da isoforma WGS humana, de cinomolgo e isoforma YRT de cinomolgo de galectina-10, clones únicos foram gerados. Extratos periplasmáticos contendo o clone VHH anti-humano e cinomolgo galectina-10 foram avaliados quanto à capacidade de ligação em ELISA e Interferometria de BioLayer (BLI).

[00323] A capacidade de ligação do VHH (extrato periplasmático) à galectina-10 humana e cinomolgo (isoformas WGS e YRT) foi analisada por ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com 1 µg/ml de galectina-10-His humana ou cinomolgo WGS ou isoforma YRT galectina-10-His, então bloqueada com PBS 1% de Caseína, antes de ser incubada com o extrato periplasmático (diluição 1/5 em PBS 0,1% de caseína) contendo o VHH-Myc marcado. A detecção dos aglutinantes foi realizada com um anticorpo anti-Myc-HRP (Bethyl, Catálogo A190-105P). O substrato TMB foi, então, adicionado e a reação foi interrompida com H_2SO_4 0,5M. A absorvância foi medida a 450 nm (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Finalmente, os dados brutos (valores de OD) foram plotados com o uso de GraphPad Prism

7.01 e são mostrados na **Figura 18**. Foi determinado o número de ligantes, definido por um valor de OD superior a 0,5, por placa MP. Um controle em branco e um controle negativo (ligação do extrato periplasmático de VHH ao alvo irrelevante) foram incluídos e mostraram, como esperado, nenhuma ligação.

Tabela 29 Caracterização dos extratos periplasmáticos de VHH por triagem ELISA

número MP	Antígeno	Ocorrências	% Hits
MP13	Gal10HIS humano	51	53,1
	cyno Gal10HIS_WGS	57	59,4
	cyno Gal10HIS_YRT	67	69,8
MP14	Gal10HIS humano	14	14,6
	cyno Gal10HIS_WGS	13	13,5
	cyno Gal10HIS_YRT	34	35,4

[00324] Além do ELISA de ligação, BLI foi usado para rastrear clones de ligação à galectina-10.

[00325] Das duas placas mestras geradas durante a seleção, 130 clones que mostraram ligação humana e de cinomolgo durante a campanha de triagem de ELISA foram selecionados e sua capacidade de ligação foi testada em BLI, usando o Octet RED96. Resumidamente, isoformas WGS ou YRT de humanos e cinomolgo de galectina-10-His marcada foram diluídas em tampão cinético (PBS 0,01% BSA 0,002% Tween 20) a 200 µg/ml antes de serem capturadas nas pontas do sensor Anti-Penta His 1K (ForteBio, Cat nº 18-5120) até que um nível de imobilização de 1 nm fosse alcançado. Em seguida, extratos

periplasmáticos diluídos (1/5 em tampão cinético) contendo os clones VHH foram aplicados e a associação/dissociação à galectina-10-His imobilizada foi medida com o uso do software ForteBio Data analysis 9.0 (subtração das pontas de referência (carregadas até 1) nm com proteína marcada com His irrelevante, modelo de ligação 1,1). Durante o rastreio, apenas a dissociação (taxa de dissociação) do VHH pode ser determinada, uma vez que a concentração eficaz do VHH é desconhecida e pode variar muito de clone para clone. Os resultados são mostrados na **Figura 19** e confirmam que a maioria dos clones VHH selecionados apresentaram reatividade cruzada de cinomolgo humano.

[00326] Os clones VHH selecionados que mostraram ligação à galectina-10 foram enviados para sequenciamento. Com base em suas sequências VHH de CDR1-2-3, cada clone foi classificado em uma família. Esse processo resultou na determinação de 44 famílias. Com base em seus dados de ligação de triagem (ELISA e BLI) e suas sequências, 15 clones VHH foram selecionados para posterior caracterização. A produção de VHH purificado foi iniciada em *E.coli*. Para esse propósito, VHH selecionados foram primeiramente cultivados em meio 2TY com baixa quantidade de glicose e a produção do VHH foi induzida por uma incubação noturna com IPTG (1 mM). No dia seguinte, os sedimentos de bactérias foram lisados por dois ciclos de congelamento/descongelamento (-80°C e -

20°C). Após a centrifugação, os VHH-His marcados foram purificados a partir do sobrenadante celular com o uso da resina de afinidade de metal Talon (Catálogo BD 635504). Finalmente, a análise SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e a integridade das moléculas de VHH (MW ~ 15 kDa).

[00327] As sequências de domínio CDR e VHH dos 15 clones selecionados para caracterização adicional são mostradas nas Tabelas 35 e 36 abaixo.

Exemplo 20. Caracterização de anticorpos VHH que se ligam a galectina-10

A. Ligação de clones VHH à galectina-10 conforme medido por ELISA

[00328] A capacidade de ligação dos 15 clones VHH foi analisada por ELISA. Resumidamente, uma placa maxisorp foi revestida durante a noite com isoformas humanas ou cinomolgo WGS ou YRT galectina-10-His a 1 µg/ml e bloqueada com PSB 1% Caseína, antes de ser incubada com uma diluição em série do VHH (a partir de 4 µM, diluição 1/3, 12 pontos de diluições). Após várias etapas de lavagem, a detecção do VHH ligado foi realizada com um anticorpo anti-Myc-HRP (Bethyl, Catálogo A190-105P). A absorvância foi medida a 450 nM (referência a 620 nm) com o instrumento Tecan. Finalmente, os dados brutos (valores de OD) foram plotados no GraphPad Prism 7.01. Os valores de EC50 de cada composto, calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta da curva

variável (quatro parâmetros)), são relatados na tabela. Como um controle positivo, o clone 1D06 do painel específico humano anterior foi incluído. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 30 Caracterização dos clones VHH de galectina-10 por ELISA

	bELISA de VHH em Gal10-HIS revestido a 1 µg/ml					
	Humano		Cyno_WGS		Cyno_YRT	
Clones (VHH)	Bmax (valores de OD)	EC50 (nM)	Bmax (valores de OD)	EC50 (nM)	Bmax (valores de OD)	EC50 (nM)
13A05	1,8	69,7	2,7	77,8	2,9	66,3
13B06	1,0	ambíguo	1,4	Ambíguo	2,0	ambíguo
13C03	2,0	30,6	0,1	/	0,1	/
13C04	1,1	ambíguo	2,7	369,1	2,5	ambíguo
13C06	2,8	27,5	2,9	10,3	2,9	16,2
13C07	1,3	106,7	2,9	7,1	2,8	33,2
13C10	1,0	ambíguo	2,3	Ambíguo	2,7	185,8
13D12	0,8	ambíguo	1,3	Ambíguo	2,4	118,9
13E07	1,1	ambíguo	2,3	371,0	2,4	ambíguo
13E09	1,8	105,7	2,3	438,4	3,0	66,9
13G12	1,6	141,0	2,9	11,8	3,1	3,1
13H07	1,5	179,9	2,7	15,6	3,1	1,3
14E02	0,7	ambíguo	1,8	Ambíguo	2,1	ambíguo
14E10	0,5	ambíguo	1,4	Ambíguo	2,7	15,8
14F10	0,5	ambíguo	2,6	60,4	3,0	3,0
1D06	1,2	90,7	0,0	/	0,0	/

[00329] Foram realizadas as seguintes observações:

• Os clones 13C06 e 13A05 foram os melhores aglutinantes de reatividade cruzada de cinomolgo humano, com uma capacidade de ligação relativa igual a valores de EC50 de 27 a 69,7 nM na galectina-10 humana e valores de EC50 de 10,3 a 77,8 nM na isoforma WGS e valores de EC50 de 16,2 a 66,3 nM na isoforma YRT de cinomolgo galectina-10.

• Os clones 13C07, 13E09, 13G12 e 13H07 mostraram uma capacidade de ligação moderada à galectina-10 humana, com

valores de EC50 entre 105 a 180 nM, mas uma forte capacidade de ligação ao cinomolgo galectina-10, com valores de EC50 entre 7,1 a 438 nM na isoforma WGS e 1,3 a 33 nM na isoforma YRT.

• O clone 13C03 mostrou uma forte ligação à galectina-10 humana, com uma capacidade de ligação relativa igual a 30 nM, mas uma ligação fraca às isoformas de cinomolgo (valor de OD Bmax 0,1).

• O clone 1D06, isolado da biblioteca de scFv anterior selecionada exclusivamente contra galectina-10 humana, apresentou um valor de EC50 igual a 90 nM, mas nenhuma reatividade cruzada de cinomolgo.

B. Clones de VHH dissolvem CLCs recombinantes humanos *in vitro*

[00330] A dissolução de CLC induzida pelo clone VHH 1D06 foi monitorada com o uso de um microscópio confocal de disco giratório. Resumidamente, a solução contendo CLCs humanos foi manchada em uma placa de poços de lâmina µ, antes de ser incubada com uma concentração fixa (50 µM ou 100 µM) do anticorpo VHH 1D06. Finalmente, para cada poço, as posições de imagem foram definidas e cada posição foi fotografada a cada 3 a 5 minutos por um total de 120 minutos. Finalmente, com base em um software, a superfície ocupada pelo CLC foi determinada, e a área inicial coberta pelo CLC no início do experimento foi definida como 1. Como controle

negativo, foi incluído um controle de isotipo VHH. O tamanho total do CLC foi medido ao longo do tempo e plotado no GraphPad Prism 7.01 (consulte a **Figura 15**). Os valores de EC50 e EC90 de cada clone VHHH foram calculados com uma regressão não linear (log (agonista) vs. resposta da curva variável (quatro parâmetros)) e são relatados na tabela abaixo.

Tabela 31 Dissolução de CLCs pelo clone VHH 1D06

Concentração (μM)	**Clones**	**Formato**	**50% de dissolução (min)**	**90% de dissolução (min)**
50	1D06	VHH	20,1	13,6
100			7,2	43,96

Tabela 32: Sequências de CDR de cadeia pesada de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
7B07	SYDMS	160	AIKNGGGITYYADSVKG	161	THGIGTLGFGS	162
8H11	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165
10A06	NYDMS	166	DINSGGGSTYYADSVKG	167	GYTGYYY	168
10B02	YHYMN	169	GISAGGGRTYYADSVKG	170	VHGITNDY	171
10D02	SYYMS	172	GIVTGGGRTHYTDSVKG	173	VNGVVTNYDY	174
11F02	TNYMN	163	GITSHGARTYYADSVKG	175	TDHASLDA	176
11F12	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165

Tabela 33: Sequências de CDR de cadeia leve de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
7B07	DGNNIGSKSAQ	177	ADEYRPE	178	QVWDGSAAV	179
8H11	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYRSSNNYV	182
10A06	GLSSGSVTSSNYPA	183	SINSRHS	184	TLYMGTGSNNVV	185
10B02	AGTSSDVGYGNYVS	180	EVNKRAS	186	ASYRNSNNWV	187
10D02	AGTSSDVGYGNYVS	180	DVNKRAS	188	ASYRSPNNVV	189
11F02	GLSSGSVTSSNYPG	190	NTNSRYS	191	ALYMGSSSYNTV	192
11F12	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYSVRNNVV	193

Tabela 34: Sequências VH e VL de anticorpos scFv que se ligam a galectina-10

clone de scFv	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
7B07	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYDMSWVRQAP GKGPEWVSAIKNGGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSWGQGTQVTVSS	194	SYELTQSASVSVALTQTAKITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPALV IYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLIISGAQAEDEADYYCQVWDG SAAVFGRGTHLTVL	195
8H11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTNYMNWVRQAP GKGLEWVSGITSGGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTALYYCARTDHAWLDAWGQGTLVTVSS	196	QAGLTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAP KLLIYAVSTRASGIPDRFSGSKSGNTASLTISGLLSEDEADYYCAS YRSSNNYVFGGGTKLTVL	197
10A06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNYDMSWVRQAP GKGPEWVSDINSGGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLLLQ MNSLKPEDTAVYYCATGYTGYYYWGQGTQVTVSS	198	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPAWYQQTPGQAP RALIYSINSRHSGVPDRFSGSISGNKAALTITGAQAEDEADYYCTL YMGTGSNNVVFGGGTHLTVL	199
10B02	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSYHYMNWVRQAP GKGLEWVSGISAGGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLNAEDTALYYCARVHGITNDYWGQGTQVTVSS	200	QSALTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGMAP KLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSGNTAFLTISGLQSEDEADYYCAS YRNSNNWVFGGGTHLTVL	201
10D02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSYYMSWVRQAP GKGLEWVSGIVTGGGRTHYTDSVKGRFTITRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARVNGVVTNYDYWGQGTQVTVSS	202	QAVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGMAP KLLIYDVNKRASGITDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYFCAS YRSPNNVVFGQGTHLTVL	203
11F02	ELQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTNYMNWVRQAP GKGLEWVSGITSHGARTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLKPEDTALYYCARTDHASLDAWGQGTLVTVSS	204	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPGWYQQKPGQAP RTLIYNTNSRYSGVPNRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCAL YMGSSSYNTVFGGGTHLTVL	205
11F12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTNYMNWVRQAP GKGLEWVSGITSGGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTALYYCARTDHAWLDAWGQGTLVTVSS	206	HSAVTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQHLPGTAP KLLIYAVSTRASGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEGDYYCAS YSVRNNVVFGGGTRLTVL	207

Tabela 35: Sequências CDR de anticorpos VHH que se ligam a galectina-10

clone de VHH	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
13G12	AYSMG	208	VISWSGGSHYDDSVKG	209	GTLYSFRYRDYDY	210

13H07	TYAMD	211	AISWHSAIYYADAVKG	212	ALRYRFNPSAMEY	213
14F10	GYAVG	214	IISWNGGTHYADSVKG	215	SPKYYFSPETYNY	216
13C06	SYSMG	217	TISWSGGFYYDDSVKG	218	GTRFSFSYREYHY	219
13C07	AYSMA	220	AITWSGGSHHDDSVKG	221	GTLYSFSYRDYDY	222
14E10	PYAMG	223	VISLSGAYTYNVNAVKG	224	SRTYYRTDESTYEY	225
13D12	SYHMM	226	ALAWRGGTYCANSVKG	227	SRRYVFDPSAMDY	228
13A05	SYSMS	229	IISWSGGTYYDDSVKG	230	GTQFSFSYREYDY	231
13C04	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
13E09	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
14E02	TYSMA	232	AITWAGGYTYGADSEKG	237	GRLFTSQSSAYQY	238
13C10	PYTMG	239	VVSSGGGTYYANSVKG	240	GSIFRWSPMSYDY	241
13E07	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
13C03	ISRMG	242	IIFSDASTDYADSVKG	243	VLRAAGYGYFNQY	244
13B06	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
1D6	TYAMG	245	AITRAGGNTYNADSVKG	246	GPRYSTISTMFPY	247

15A2	SYSMG	217	TISWSGGNYVDNSVKG	248	GTQFSFSYRQYDY	249

Tabela 36: Sequências de domínio VHH de anticorpos VHH que se ligam a galectina-10

Clone	**sequência de VHH**	**SEQ ID NO**
13G12	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSAYSMGWFRQAPGKEREFVAVISWSGGSHYDDSVKGRFTISRDGAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAVGTLYSFRYRDYDYWGQGTQVTVSS	250
13H07	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSTYAMDWFRQAPGKEREFVAAISWHSAIYYADAVKGRFTISRDNGKNTMYLQMNNLKPEDTA VYFCAAALRYRFNPSAMEYWGKGTLVTVSS	251
14F10	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSGYAVGWFRQAPGKEREFVTIISWNGGTHYADSVKGRFAISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTA VYYCAVSPKYYFSPETYNYWGQGTQVTVSS	252
13C06	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSSYSMGWFRQAPGKEREFVATISWSGGFYYDDSVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAAGTRFSFSYREYHYWGQGTQVTVSS	253
13C07	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSAYSMAWFRQAPGKEREFVAAITWSGGSHHDDSVKGRFTISRDGAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAVGTLYSFSYRDYDYWGQGTQVTVSS	254
14E10	ELQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASEGTFRPYAMGWFRQAPRKEREFVAVISLSGAYTYNVNAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTPEDT AIYYCGASRTYYRTDESTYEYWGQGTQVTVSS	255
13D12	QLQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAALAWRGGTYCANSVKGRCTISRDNAQDTVYLQMNSLKPEDTA VYFCAASRRYVFDPSAMDYWAKGTLVTVSS	256
13A05	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSSYSMSWFRQAPGKEREFVAIISWSGGTYYDDSVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAAGTQFSFSYREYDYWGQGTQVTVSS	257
13C04	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREFVAAITRSGGNTYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNSLKPEDTA AYHCAAGGTYSFVPRSYNYWGQGTQVTVSS	258
13E09	QVQVQESGGGLVQAGNSLRLSCAASGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAAIAWRGGTYCANSVKGRCTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTA VYFCAASLRYVFDPSAMDYWGKGTLVTVSS	259
14E02	QVQLVESGGGLAQAGGSLRLSCVASGRAAGTYSMAWFRQAPGKEREFVAAITWAGGYTYGADSEKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDT AVYSCAGGRLFTSQSSAYQYWGQGTQVTVSS	260
13C10	QLQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTFNPYTMGWFRQAPGKEREFVAVVSSGGGTYYANSVKGRFTISRDNAKATVYLQMNSLKPEDTA	261

	VYYCAAGSIFRWSPMSYDYWGQGTQVTVSS	
13E07	ELQVVESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAAIAWRGGTYCANSVKGRCTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTA VYFCAASLRYVFDPSAMDYWGKGTLVTVSS	262
13C03	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSISRMGWYRQAPGKQRELVAIIFSDASTDYADSVKGRFTISRSNAKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCKSVLRAAGYGYFNQYWGQGTQVTVSS	263
13B06	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREFVAAITRSGGNTYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNSLKPEDTA AYHCAAGGTYSFVPRSYNYWGQGTQVTVSS	264
1D6	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASENSVSTYAMGWFRQAPGKEREFVAAITRAGGNTYNADSVKGRFTISRDNAENTIYLQMNSLKPEDT AVYSCAAGPRYSTISTMFPYWGQGTQVTVSS	265
15A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSYSMGWFRQAPGKEREFVATISWSGGNYVDNSVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAAGTQFSFSYRQYDYWGQGTQVTVSS	266

[00331] A presente invenção não deve ser limitada em escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. De fato, várias modificações da invenção adicionalmente àquelas descritas no presente documento se tornarão aparentes àqueles especialistas no assunto da técnica a partir da descrição anterior e dos desenhos anexos. Tais modificações pretendem ser abrangidas pelo escopo das reivindicações anexas. Além disso, todas as modalidades descritas no presente documento são consideradas amplamente aplicáveis e combináveis com quaisquer e todas as outras modalidades consistentes, conforme apropriado.

Incorporação a título de Referência

[00332] Várias publicações são citadas na descrição anterior e ao longo dos seguintes exemplos, cada um dos quais é incorporado a título de referência neste documento em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Antagonista que se liga a galectina-10 **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo de galectina-10 e, assim, protege uma interface de empacotamento de cristal de galectina-10.

2. Antagonista, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, quando ligado à galectina-10 solúvel, inibe a cristalização da galectina-10 e/ou que, quando ligado à galectina-10 cristalina, promove a dissolução da galectina-10 cristalina.

3. Antagonista que se liga à galectina-10 **caracterizado** pelo fato de que, quando ligado à galectina-10 solúvel, inibe a cristalização da galectina-10.

4. Antagonista que se liga à galectina-10 **caracterizado** pelo fato de que, quando ligado à galectina-10 cristalina, promove a dissolução da galectina-10 cristalina.

5. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo de galectina-10 que compreende um ou mais aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10.

6. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que se liga à galectina-10 humana.

7. Antagonista, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 e Lys141, em que os resíduos são identificados com referência à SEQ ID NO: 141.

8. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende Tyr69 ou um epítopo que compreende um aminoácido adjacente a Tyr69.

9. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117 e Ala120.

10. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste nos aminoácidos Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69,

Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119, Ala120 e Lys122.

11. Antagonista, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo compreende adicionalmente Gln74 e Asp98.

12. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que consiste em aminoácidos das interfaces de empacotamento de cristal de galectina-10.

13. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos da interface de dimerização da galectina-10.

14. Antagonista, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 e Asp129.

15. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende Glu33, Gly59, Arg60 e Lys79.

16. Antagonista, de acordo com a reivindicação 15,

caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende ou consiste em Leu31, Glu33, Gly59, Arg60, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 e Gln84.

17. Antagonista, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo compreende adicionalmente Gln74, Gln75 e Glu77.

18. Antagonista, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 e Ser109.

19. Antagonista, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Trp72, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Gln84 e Ser109.

20. Antagonista, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo compreende ou consiste em Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Phe83, Gln84.

21. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste em Thr42, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119 e Ala120.

22. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o

antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste em Glu43, Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Lys117, Glu119 e Ala120.

23. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste em Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Gln74, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Ile116 e Lys117.

24. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista se liga a um epítopo que compreende ou consiste em Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87 , Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 e Phe135.

25. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista é selecionado do grupo que consiste em: uma pequena molécula; um polipeptídeo inibidor; um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e um mimético de anticorpo selecionado de um aficorpo, uma afilina, uma afitina, uma adnectina, um atrímero, uma evasina, um DARPin, uma anticalina, um avímero, um finômero, um versocorpo e uma duocalina

26. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado** pelo fato de que o

antagonista é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

27. Antagonista, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é uma imunoglobulina, de preferência uma IgG.

28. Antagonista, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista é um anticorpo VHH.

29. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é uma variante humanizada ou germinada de um anticorpo não humano.

30. Antagonista, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo não humano é derivado de camelídeo.

31. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 30, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo compreende o domínio CH1, a região de dobradiça, o domínio CH2 e/ou o domínio CH3 de uma IgG humana, de preferência IgG1.

32. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 31, **caracterizado** pelo fato de que o fragmento de ligação a antígeno é selecionado do grupo que consiste em: um domínio variável da cadeia leve do anticorpo (VL); um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH

ou VHH); um anticorpo de cadeia simples (scFv); um fragmento F(ab')2; um fragmento Fab; um fragmento Fd; um fragmento Fv; um anticorpo de um braço (monovalente); diacorpos, triacorpos, tetracorpos ou qualquer molécula de ligação ao antígeno formada por combinação, montagem ou conjugação de tais fragmentos de ligação a antígeno.

33. Antagonista, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um fragmento Fab.

34. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH e VL compreendem as sequências CDR selecionadas do grupo consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 3; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 2; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 58; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 57; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 56;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 5; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 61; LCDR2 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 60; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 59;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 9; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 8; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 7; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 64; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 62;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 12; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 10; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 15; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 14; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 13; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 70; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 69; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 68;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 18; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 17; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 16; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 72; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 20; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 19; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 75; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 74; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 73;

(viii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 23; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 22; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 21; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(ix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 25; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 24; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 77; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 76;

(x) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 28; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 27; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 26; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 79;

(xi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 31; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 30; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 29; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80;

(xii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 33; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 32; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 84; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 83; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 82;

(xiii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 35; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 34; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 87; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 86; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 85;

(xiv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 38; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 37; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 88;

(xv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

41; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 40; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 39; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 91; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 90; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 89;

(xvi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 43; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 42; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 92;

(xvii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 44; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xviii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 47; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 46; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 45; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(xix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 50; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

49; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 48; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xx) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 52; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 51; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 98; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80; e

(xxi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 55; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 54; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 53; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71.

35. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 34, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que

compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 ou

uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(viii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98%

ou 99% idêntica a isso;

(x) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 126 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xviii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos

de SEQ ID NO: 133 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xx) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(xxi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

36. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH e VL compreendem as sequências CDR selecionadas do grupo consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 162; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 161; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 160; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 179; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 178; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 177;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 182; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 168; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 167; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 166; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 185; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 184; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 183;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 171; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 170; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 169; LCDR3

que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 187; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 186; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 174; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 173; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 172; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 189; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 188; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 176; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 175; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 192; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 191; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 190; e

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 193; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180.

37. Antagonista, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável

de cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 195 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98%

ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 203 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 205 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 206 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

38. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo compreende um domínio VHH que compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 210; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 209;

CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 213; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 212; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 216; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 215; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 219; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 218; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 222; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 221; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 225; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 224; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 228; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 227; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 231; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 230; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 238; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 237; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 241; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 240; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 239;

(xiii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xiv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 244; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 243; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 242;

(xv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xvi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 247; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 246; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 245; e

(xvii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 249; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 248; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217.

39. Antagonista, de acordo com a reivindicação 38,

caracterizado pelo fato de que o domínio VHH compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada por qualquer uma das SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265 ou 266, ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

40. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é **caraterizado** pelo fato de que compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH e VL compreendem sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 3; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 2; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 58; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 57; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 56;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 5; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 61; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 60; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 59;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 9; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 8; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 7; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 64; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 62;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 12; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 10; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 15; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 14; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 13; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 70; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 69; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 68;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 18; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 17; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 16; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 72; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID

NO: 20; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 19; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 75; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 74; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 73;

(viii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 23; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 22; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 21; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 65;

(ix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 25; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 24; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 77; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 76;

(x) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 28; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 27; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 26; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 67; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 66; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 79;

(xi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 31; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 30;

HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 29; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80;

(xii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 33; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 32; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 1; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 84; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 83; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 82;

(xiii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 35; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 34; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 87; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 86; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 85;

(xiv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 38; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 11; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 37; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 78; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 88;

(xv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 41; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 40; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 39; LCDR3

que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 91; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 90; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 89;

(xvi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 43; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 42; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 92;

(xvii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 6; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 44; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 4; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xviii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 47; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 46; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 45; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 94; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71;

(xix) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 50; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 49; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 48; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 96; LCDR2

que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 63; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 95;

(xx) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 36; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 52; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 51; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 98; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 97; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 80; e

(xxi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 55; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 54; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 53; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 81; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 93; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 71.

41. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98%

ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 107 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(viii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(x) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 117 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xiv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos

90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 126 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xvii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xviii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que

compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xix) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(xx) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(xxi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

42. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é **caraterizado** pelo fato de que compreende um domínio de cadeia pesada variável (VH) e

um domínio de cadeia leve variável (VL), em que os domínios VH e VL compreendem sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 162; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 161; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 160; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 179; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 178; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 177;

(ii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 182; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(iii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 168; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 167; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 166; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 185; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 184; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 183;

(iv) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 171; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 170; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 169; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 187; LCDR2 que

compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 186; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(v) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 174; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 173; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 172; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 189; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 188; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180;

(vi) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 176; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 175; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 192; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 191; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 190; e

(vii) HCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 165; HCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 164; HCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 163; LCDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 193; LCDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 181; LCDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 180.

43. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga à galectina-10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma combinação de um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de

cadeia leve (VL) selecionado a partir do disposto a seguir:

(i) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 195 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(ii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(iv) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(v) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 203 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso;

(vi) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 205 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso; e

(vii) um VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 206 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso e um VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

44. Anticorpo que se liga a galectina-10, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende um domínio VHH que compreende as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 210; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 209; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 213; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 212; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 216; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 215; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 219; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 218; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 222; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 221; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 225; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 224; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 228; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 227; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 231; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 230; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO:

236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 238; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 237; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 241; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 240; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 239;

(xiii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 236; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 235; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 226;

(xiv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 244; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 243; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 242;

(xv) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 234; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 233; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 232;

(xvi) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 247; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 246; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 245; e

(xvii) CDR3 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 249; CDR2 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 248; CDR1 que compreende ou que consiste em SEQ ID NO: 217.

45. Anticorpo que se liga a galectina-10, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende um

domínio VHH e em que o domínio VHH compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada por qualquer uma das SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265 ou 266, ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica a isso.

46. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo **caracterizado** pelo fato de que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 34 a 45.

47. Polinucleotídeo isolado **caracterizado** pelo fato de que codifica o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 34 a 45 ou um domínio VH, VL ou VHH do mesmo.

48. Vetor de expressão **caracterizado** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, conforme definido na reivindicação 47, operacionalmente ligado a sequências regulatórias que permitem a expressão do anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, domínio de cadeia pesada variável, domínio de cadeia leve variável ou domínio VHH em uma célula hospedeira ou sistema de expressão livre de células.

49. Célula hospedeira ou sistema de expressão livre de células **caracterizado** pelo fato de que contém o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 48.

50. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende um antagonista, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, ou um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 40 a 46, e pelo menos um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

51. Antagonista, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 40 a 46, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 50, **caracterizada** pelo fato de que é para uso como medicamento.

52. Método de tratamento de um indivíduo em necessidade disso, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 40 a 46, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 50.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ou composição farmacêutica é administrado para prevenir ou tratar uma doença ou condição associada à presença ou formação de cristais de galectina-

10.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52 ou 53, **caracterizado** pelo fato de que o antagonista, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ou composição farmacêutica é administrado para prevenir ou tratar uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: asma; rinossinusite crônica; doença celíaca; infecção por helmintos; inflamação eosinofílica gastrointestinal; fibrose cística (CF); aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA); vasculite de Churg-Straus; pneumonia eosinofílica crônica; e leucemia mieloide aguda.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado** pelo fato de que a doença ou condição é asma.

56. Uso de um antagonista, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, ou um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 40 a 46, **caracterizado** pelo fato de que é para a detecção de galectina-10 em uma amostra obtida de um paciente.

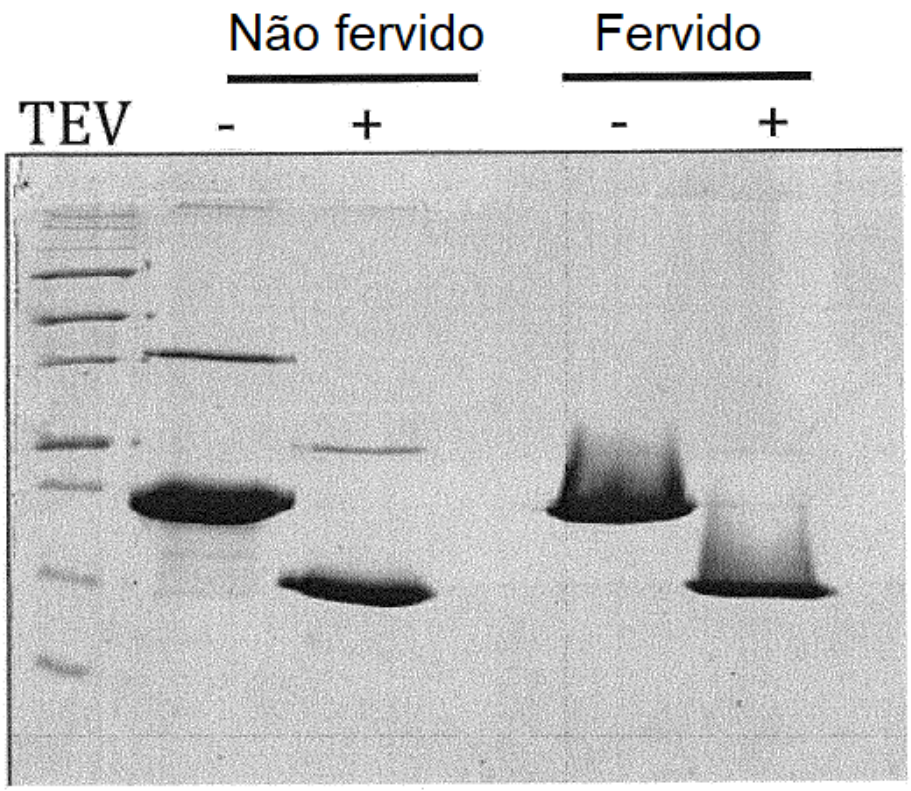
57. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que a amostra do paciente é uma amostra de muco ou uma amostra de escarro.

58. Kit **caracterizado** pelo fato de que compreende um antagonista, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, ou um anticorpo ou fragmento de

ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 40 a 46.

Fig. 1

A


Não fervido
Fervido
TEV
-
+
-
+

B

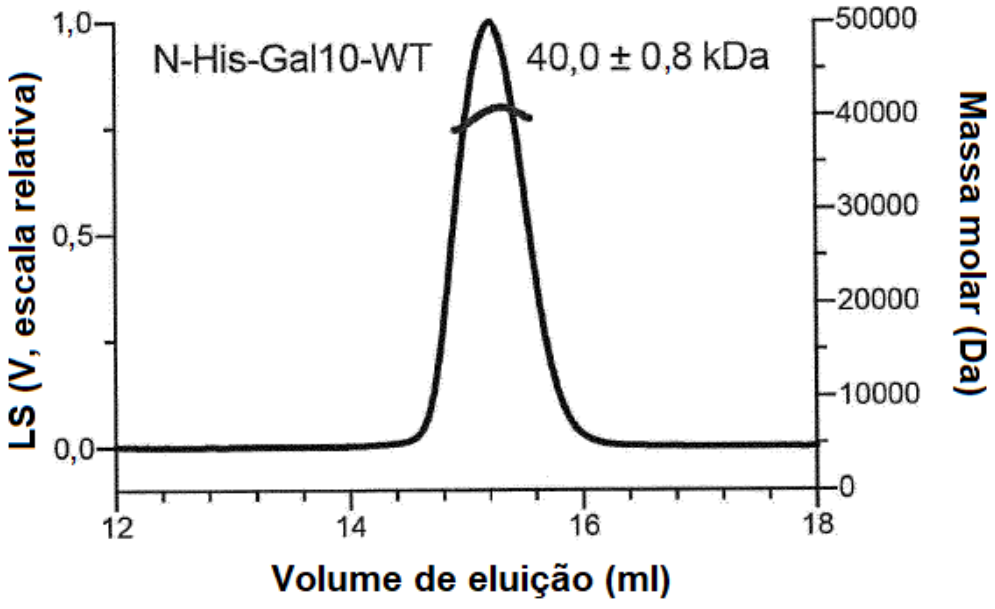
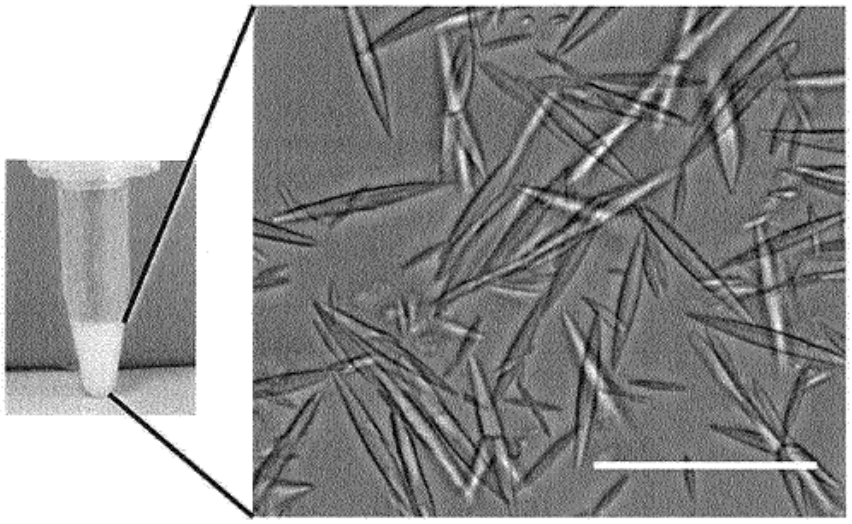
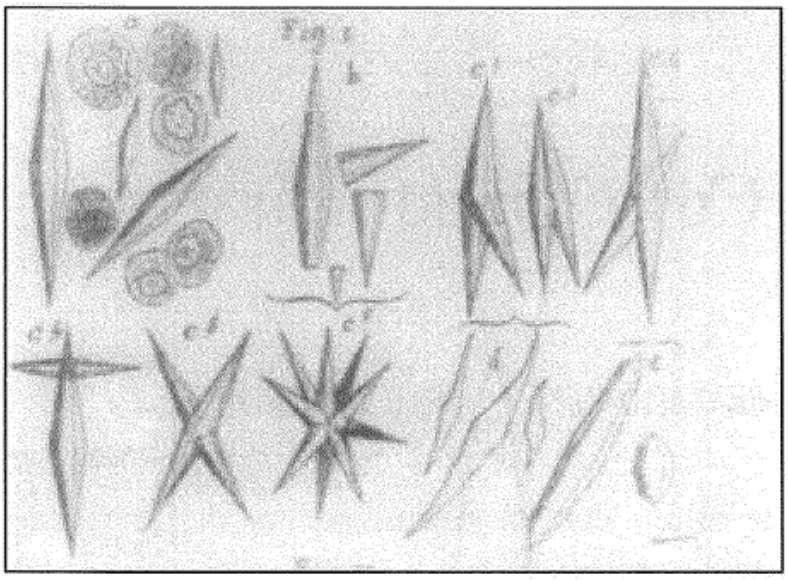

N-His-Gal10-WT
40,0 ± 0,8 kDa
LS (V, escala relativa)
1,0
0,5
0,0
Massa molar (Da)
50000
40000
30000
20000
10000
0
12
14
16
18
Volume de eluição (ml)

Fig. 1 (continuação)

C



D



E

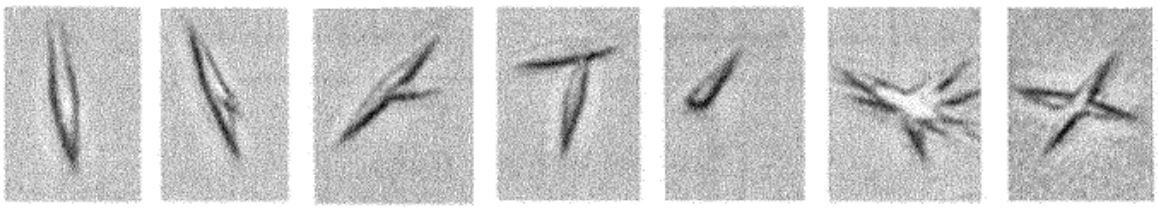


Fig. 2

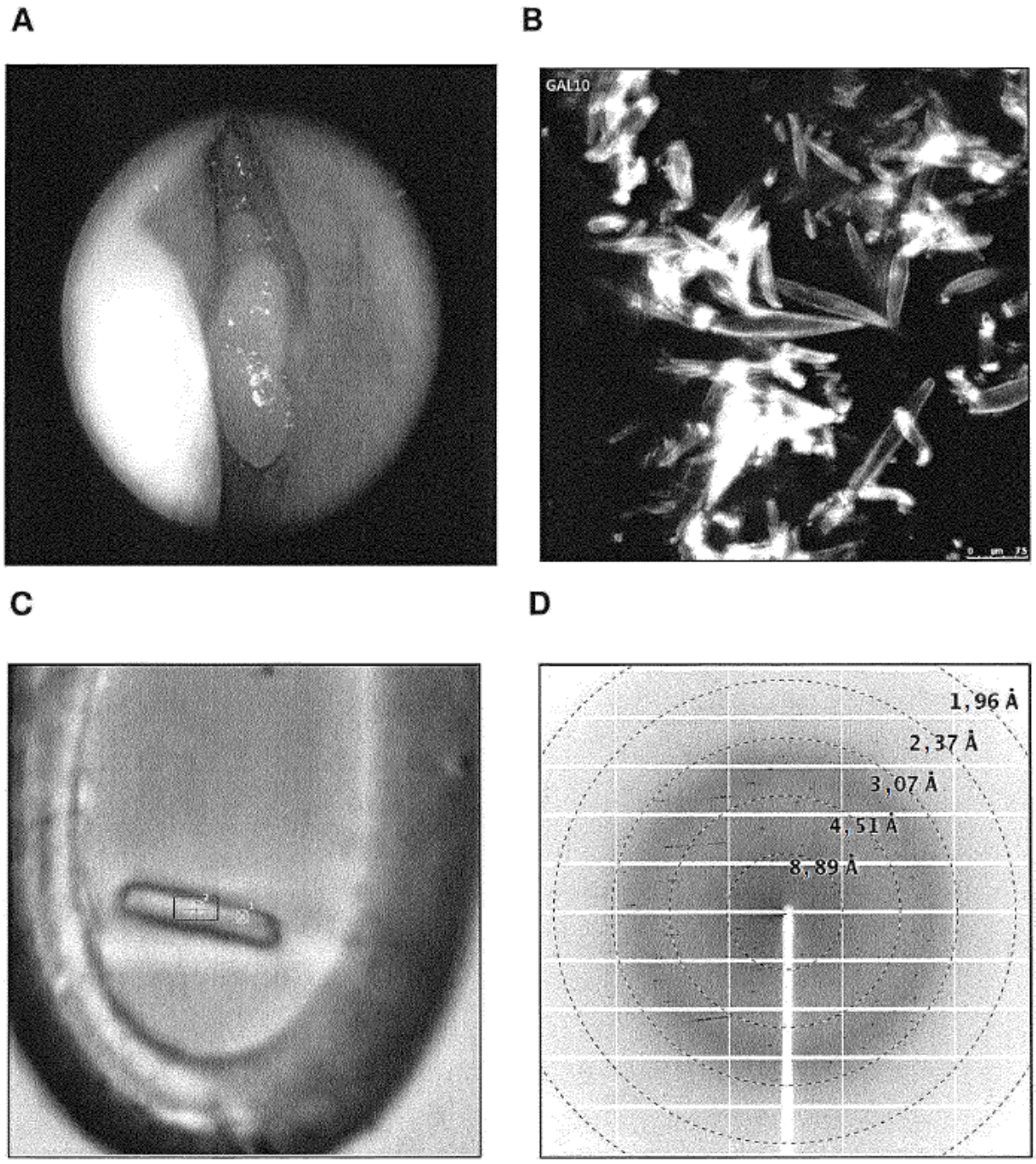


Fig. 2 (continuação)

E



F

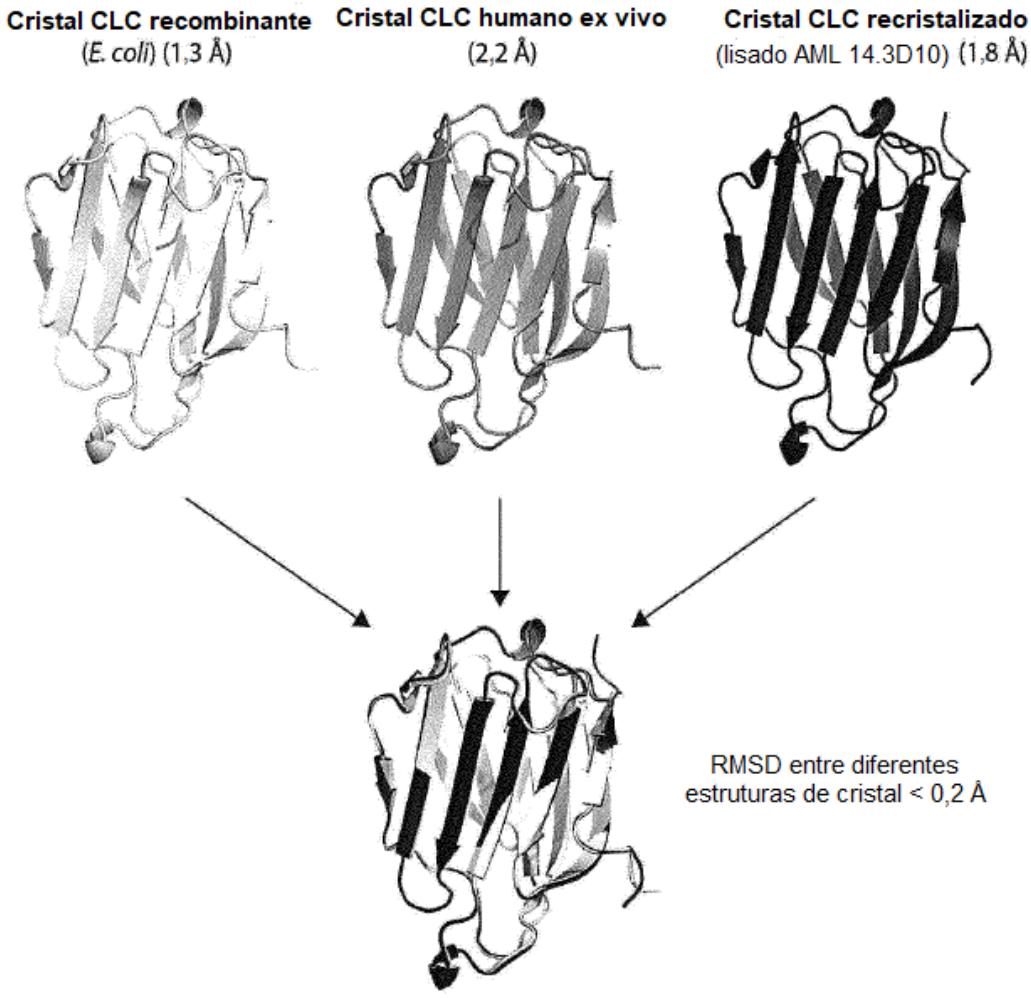
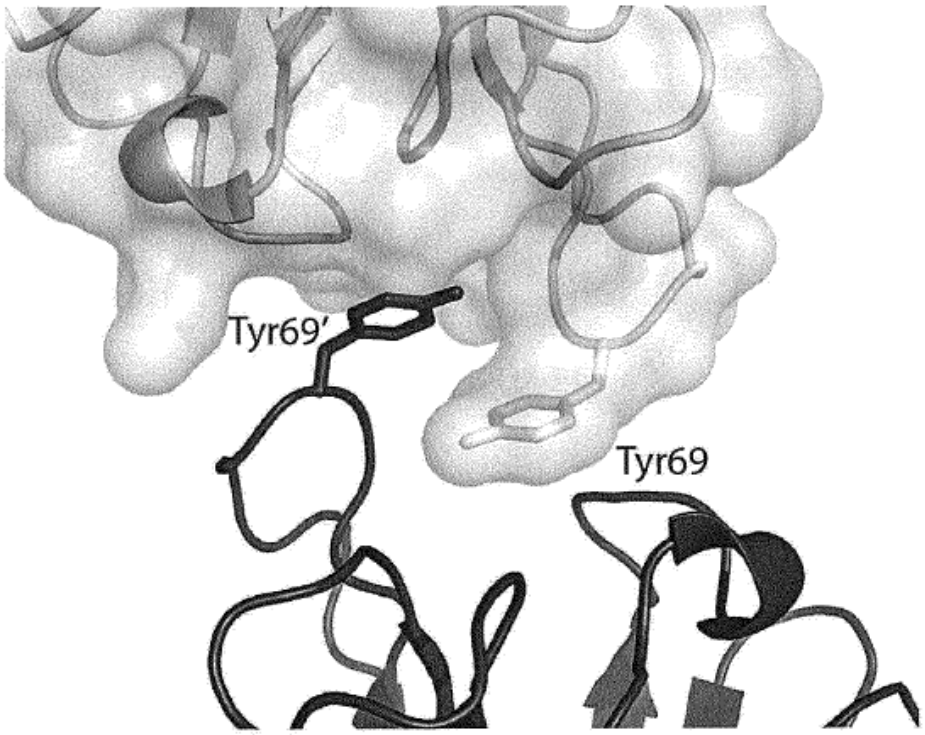


Fig. 3

A



B

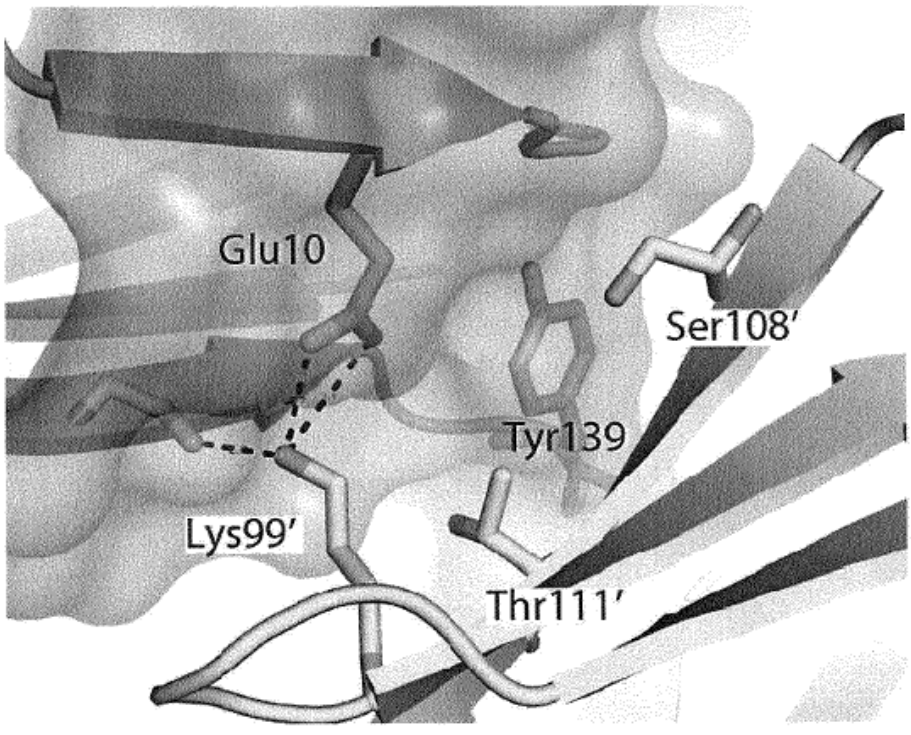


Fig. 3 (continuação)

C

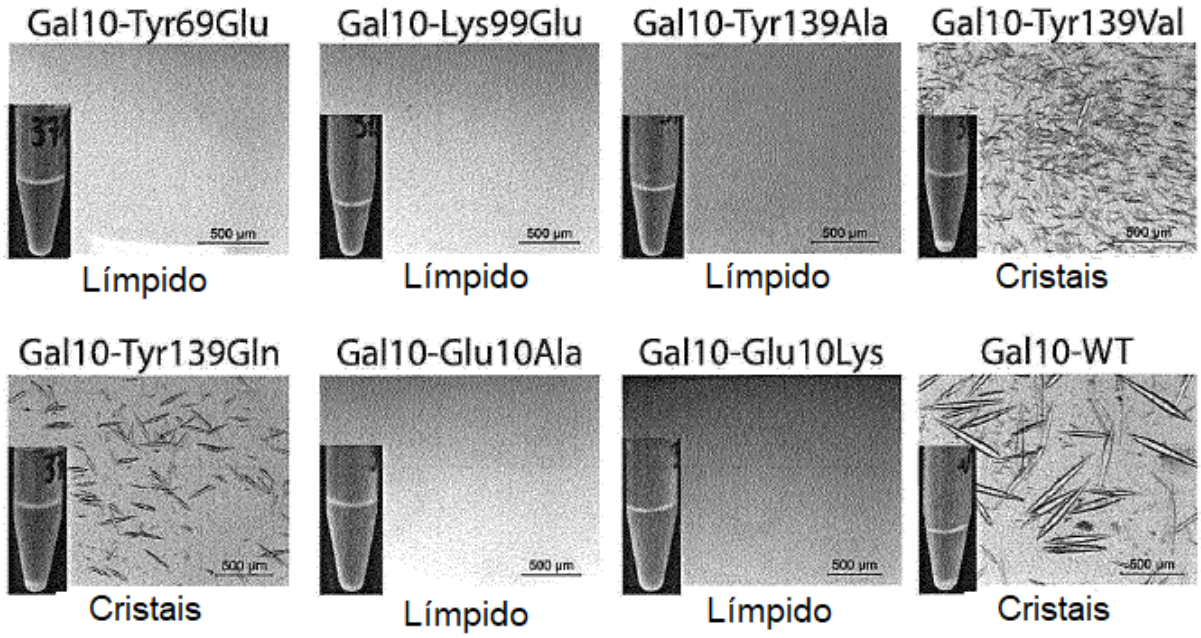
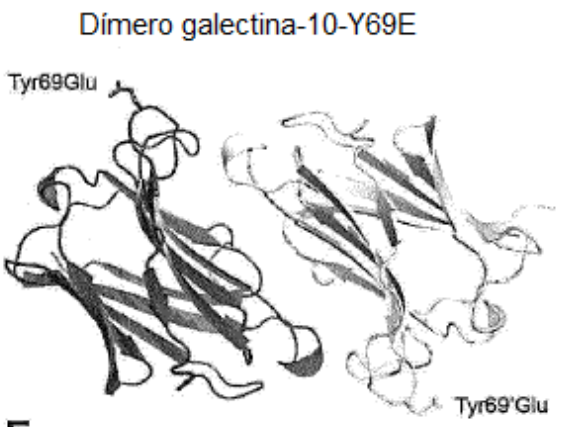
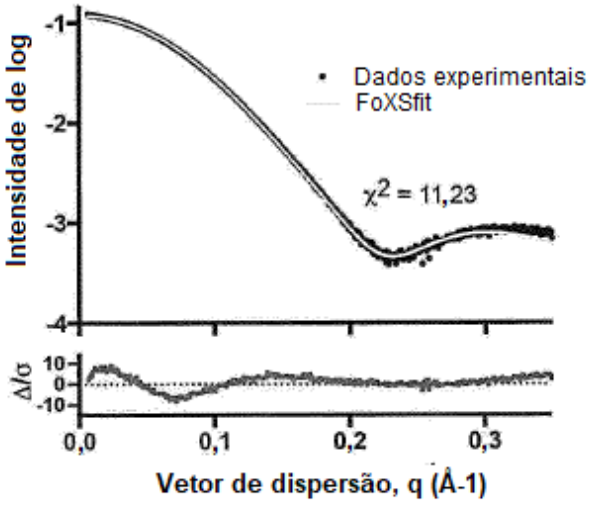


Fig. 3 (continuação)

D



E



F



Dímero galectina-10 cristalográfico
(pdb 1LCL)

Dímero Galectina-10-Y69E

RMSD < 0.3 Å

Fig. 4

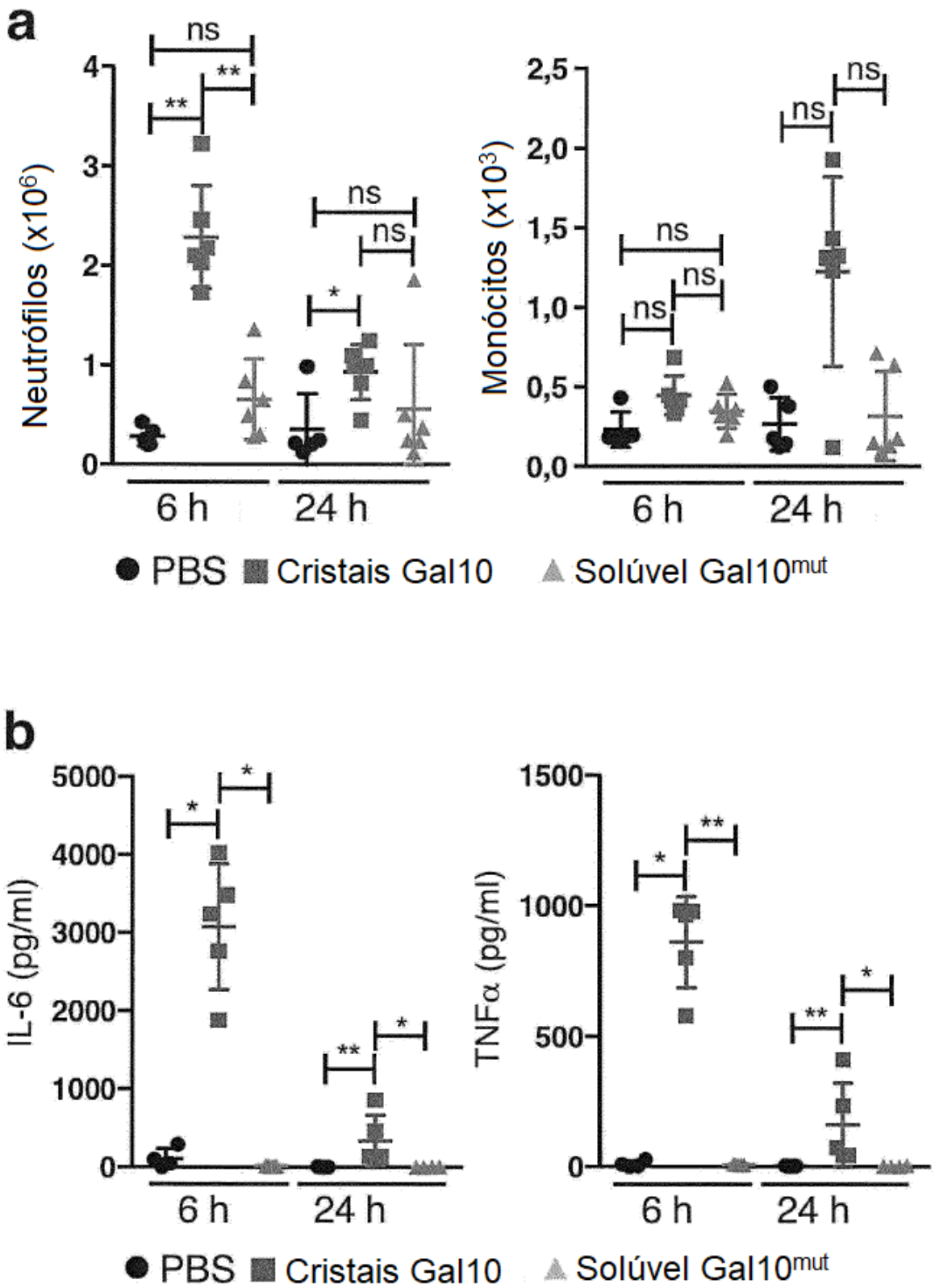

a
Neutrófilos (x10⁶)
Monócitos (x10³)
ns
**
*
6 h
24 h
PBS
Cristais Gal10
Solúvel Gal10mut
b
IL-6 (pg/ml)
TNFα (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
1500
500
0
6 h
24 h
PBS
Cristais Gal10
Solúvel Gal10mut

Fig. 4 (continuação)

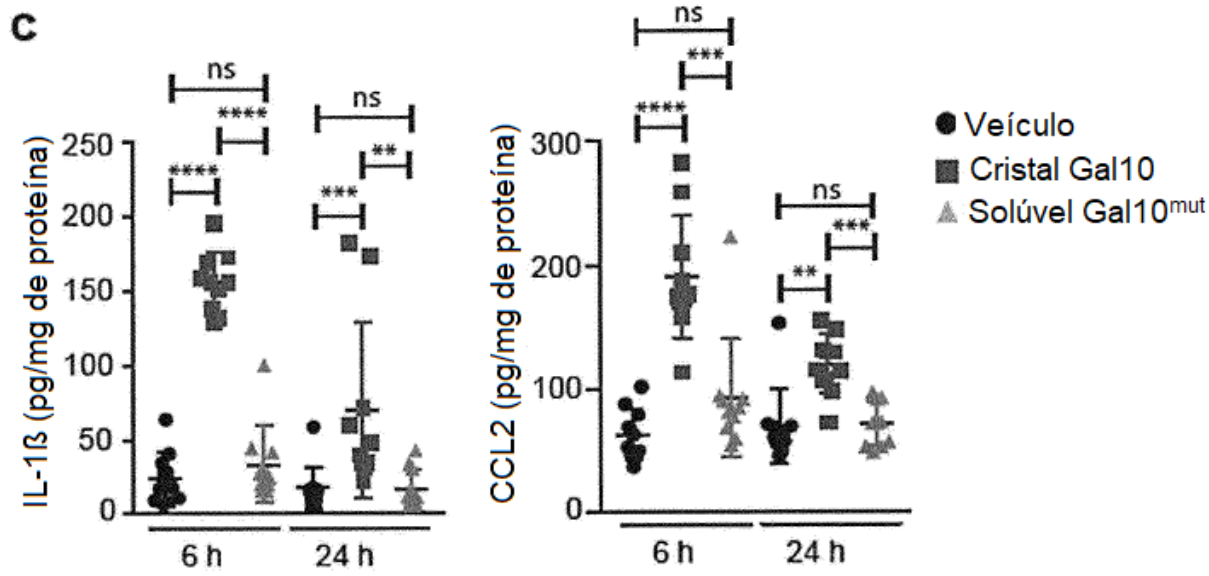


Fig. 5

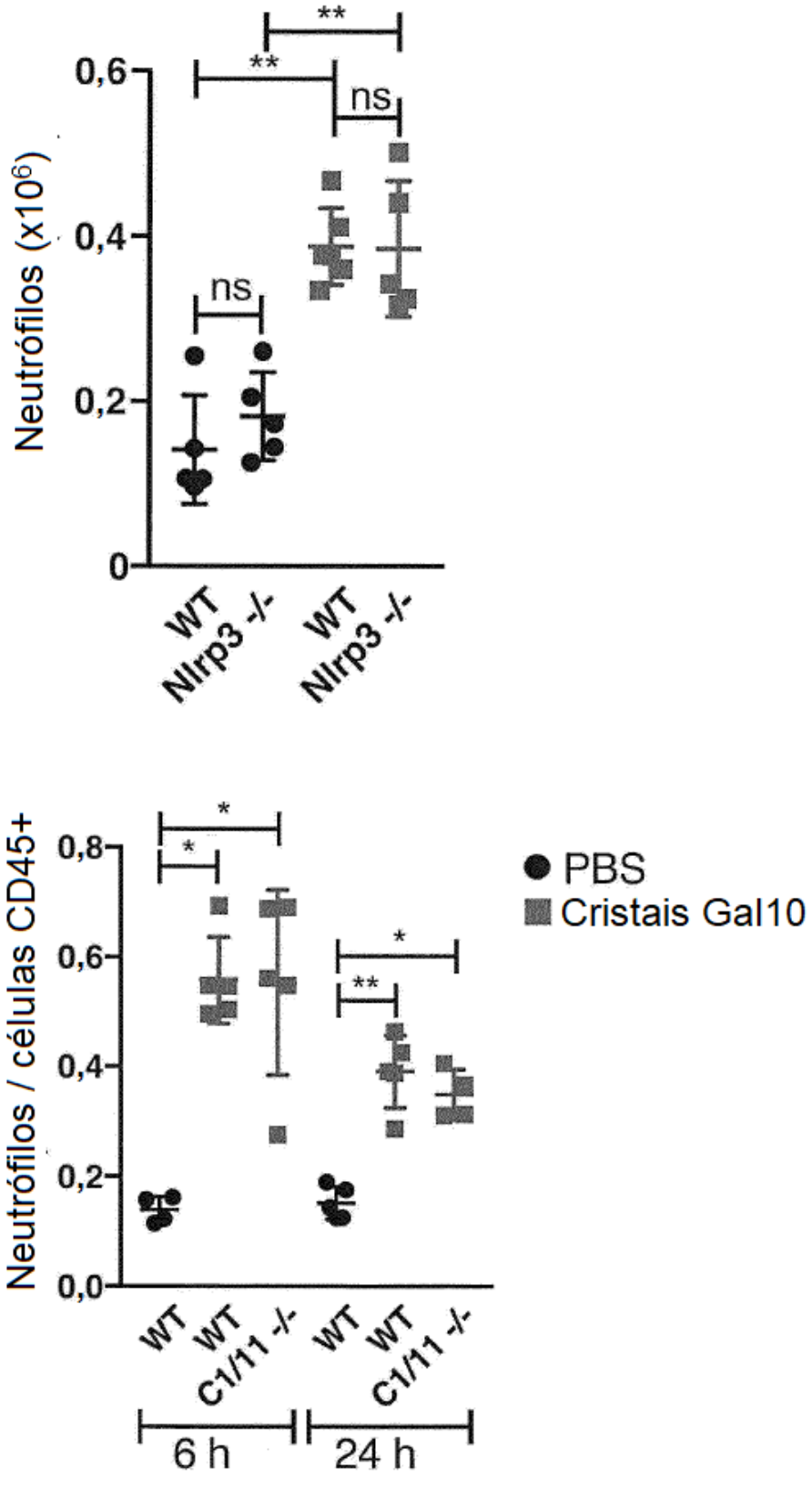

**
**
ns
ns
0,6
0,4
0,2
0
Neutrófilos (x10⁶)
WT
Nlrp3 -/-
WT
Nlrp3 -/-
*
*
*
**
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Neutrófilos / células CD45+
PBS
Cristais Gal10
WT
WT
C1/11 -/-
WT
WT
C1/11 -/-
6 h
24 h

Fig. 6

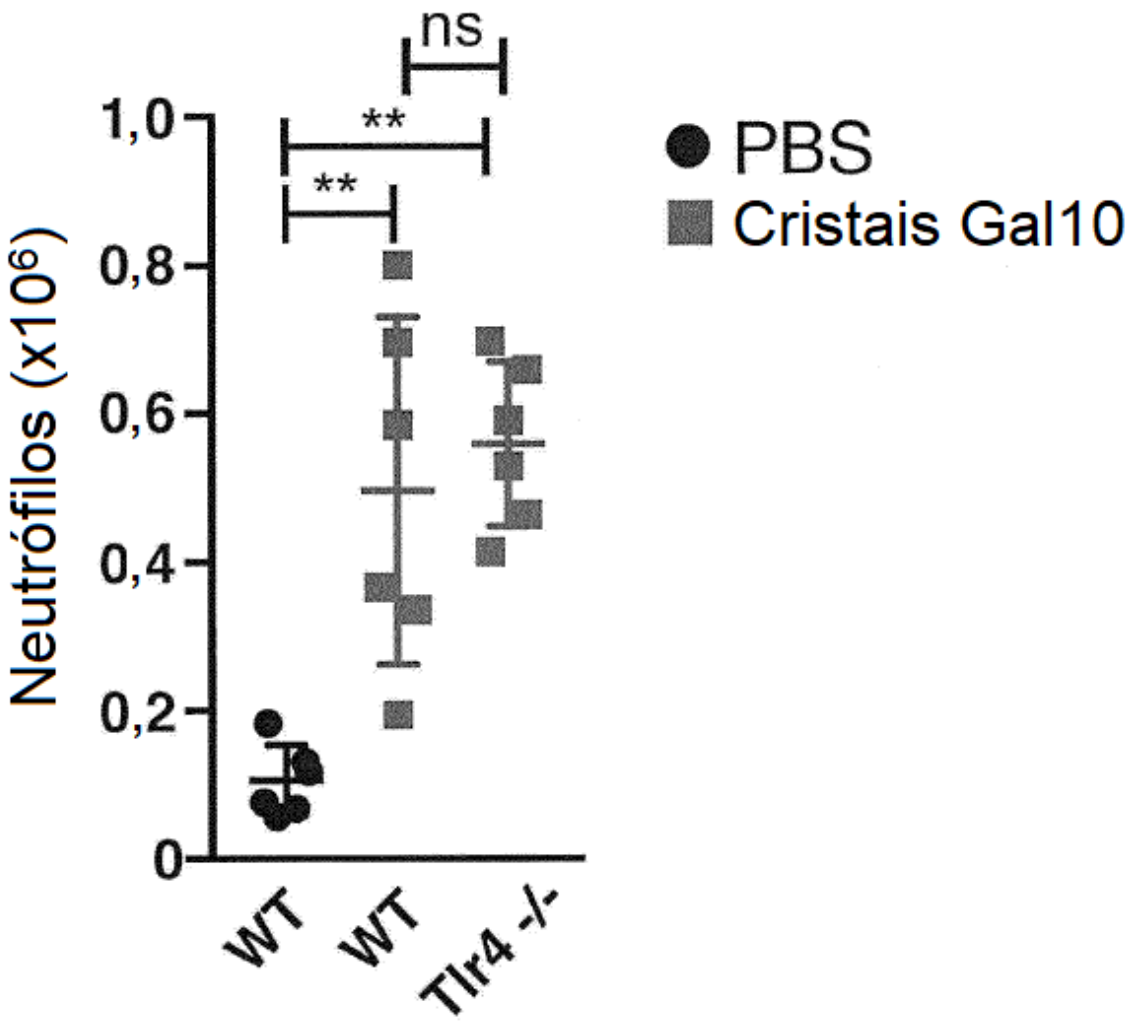
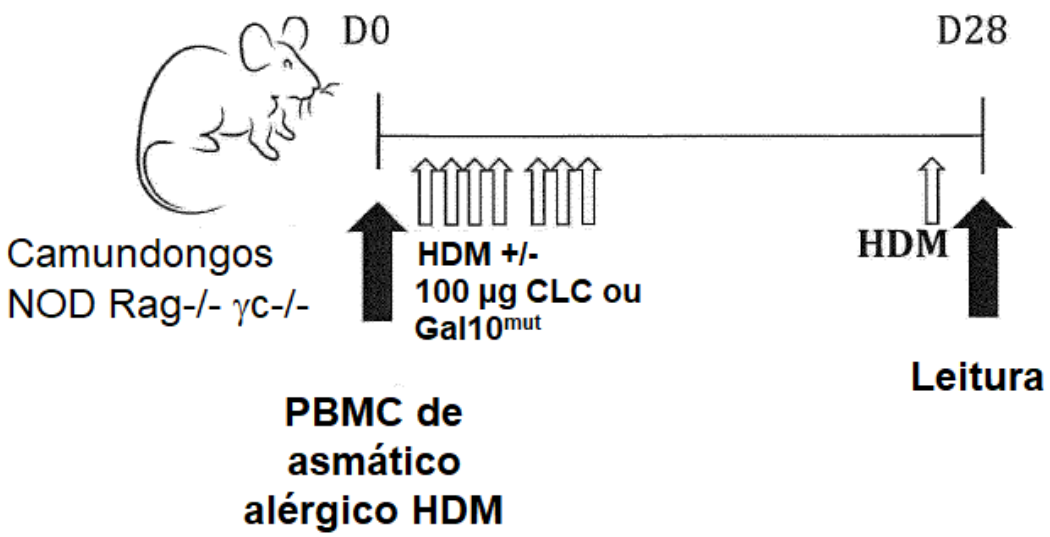
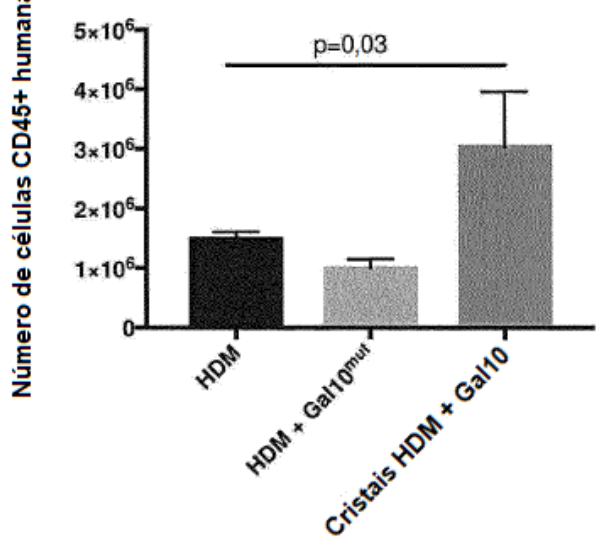

ns
**
**
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Neutrófilos (x10⁶)
WT
WT
Tlr4 -/-
PBS
Cristais Gal10

Fig. 7

A


D0
D28
Camundongos
NOD Rag-/- γc-/-
HDM +/-
100 µg CLC ou
Gal10mut
HDM
Leitura
PBMC de
asmático
alérgico HDM

B


Número de células CD45+ humanas
5×10⁶
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
p=0,03
HDM
HDM + Gal10mut
Cristais HDM + Gal10

C

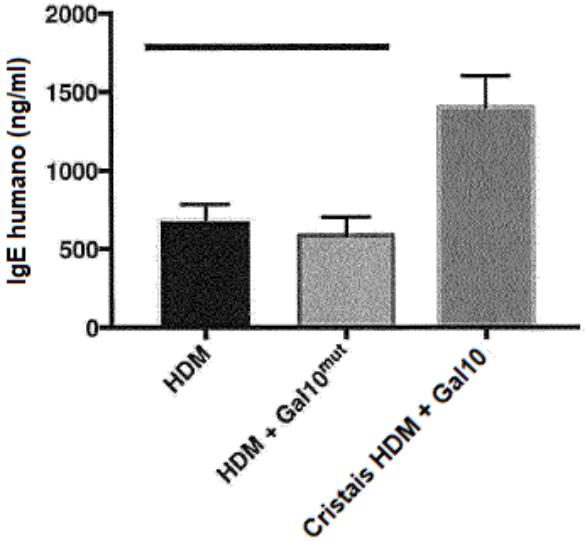

IgE humano (ng/ml)
2000
1500
1000
500
0
HDM
HDM + Gal10mut
Cristais HDM + Gal10

Fig. 8

A

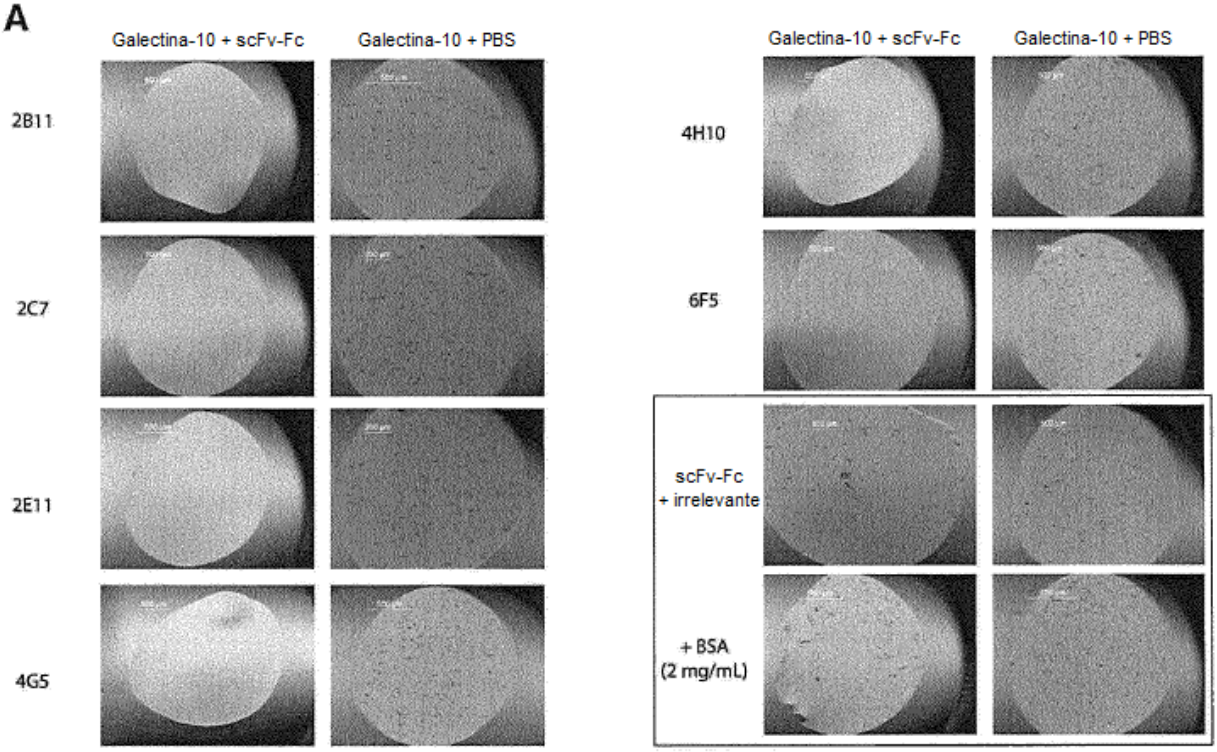
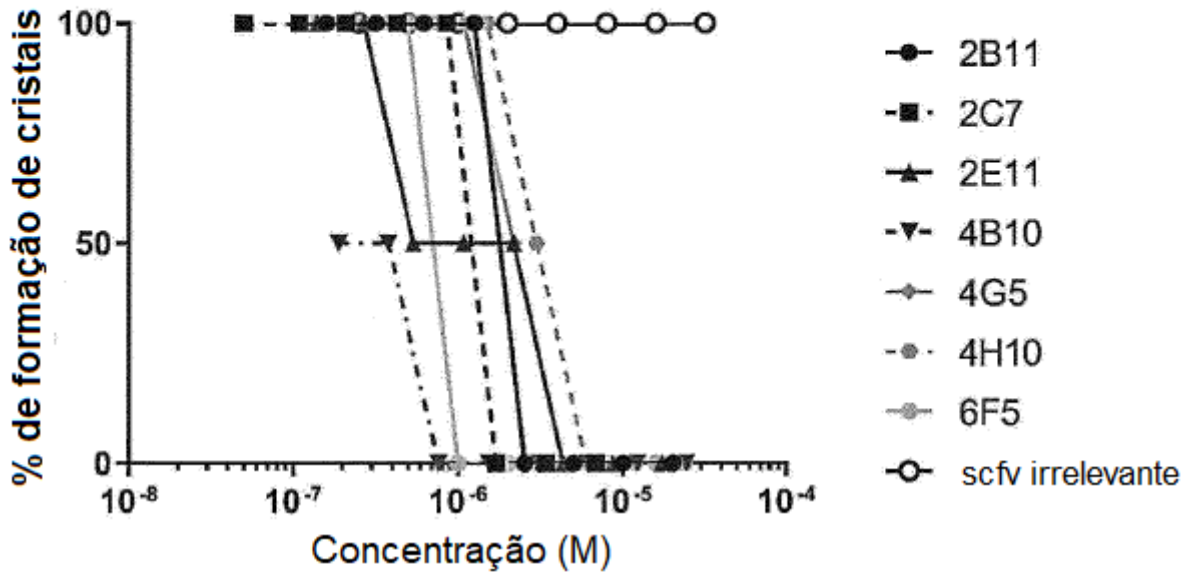

Galectina-10 + scFv-Fc
Galectina-10 + PBS
2B11
2C7
2E11
4G5
Galectina-10 + scFv-Fc
Galectina-10 + PBS
4H10
6F5
scFv-Fc
+ irrelevante
+ BSA
(2 mg/mL)

Fig. 8 (continuação)

B



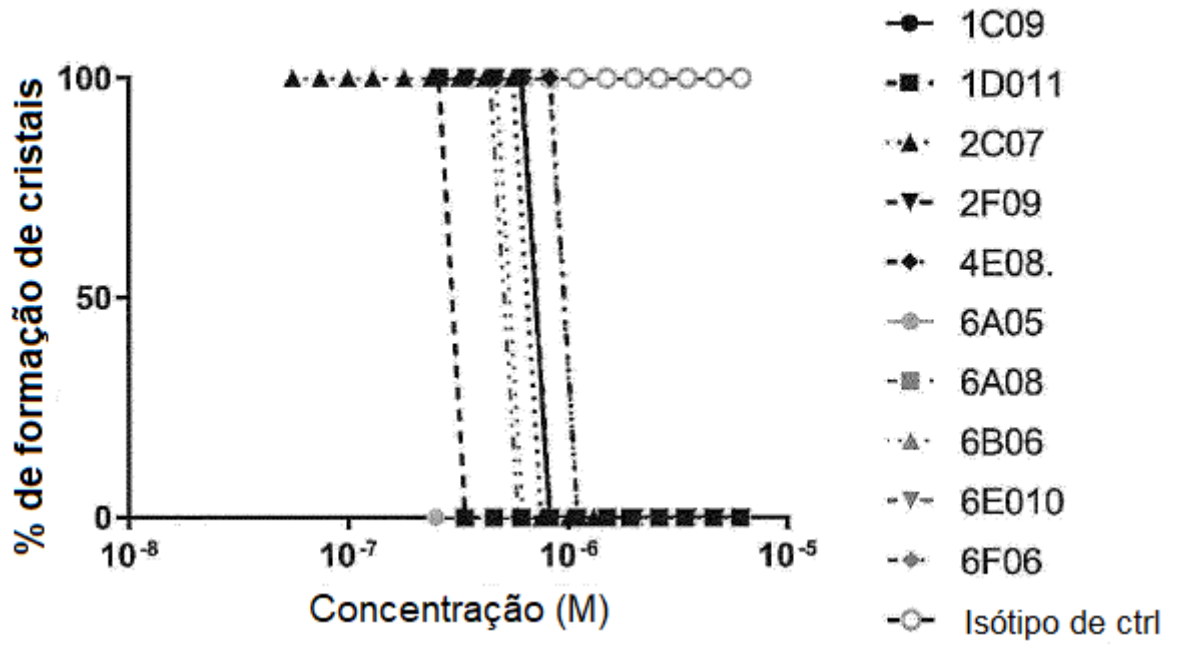


Fig. 9

A

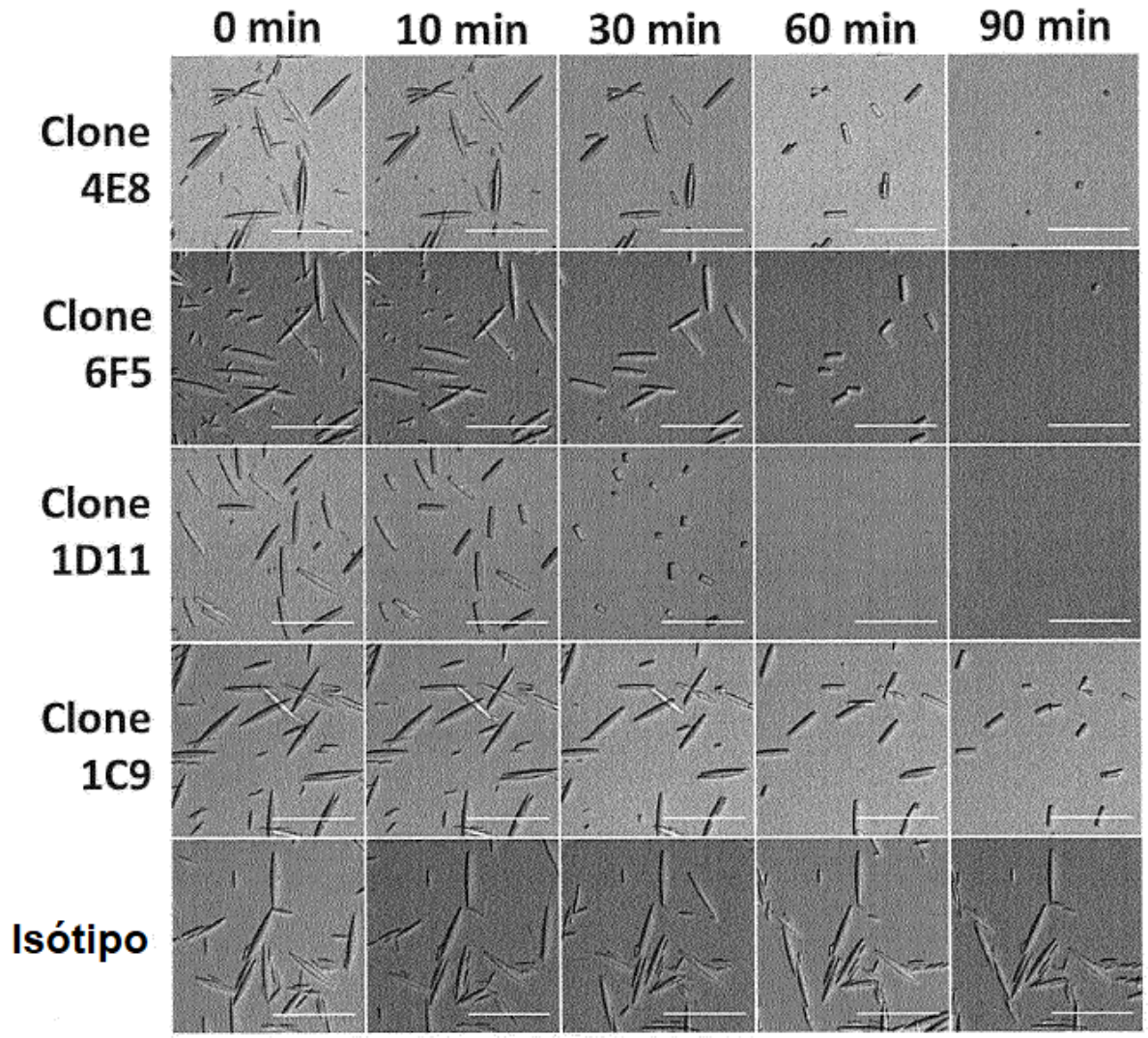

0 min
10 min
30 min
60 min
90 min
Clone 4E8
Clone 6F5
Clone 1D11
Clone 1C9
Isótipo

Fig. 9 (continuação)

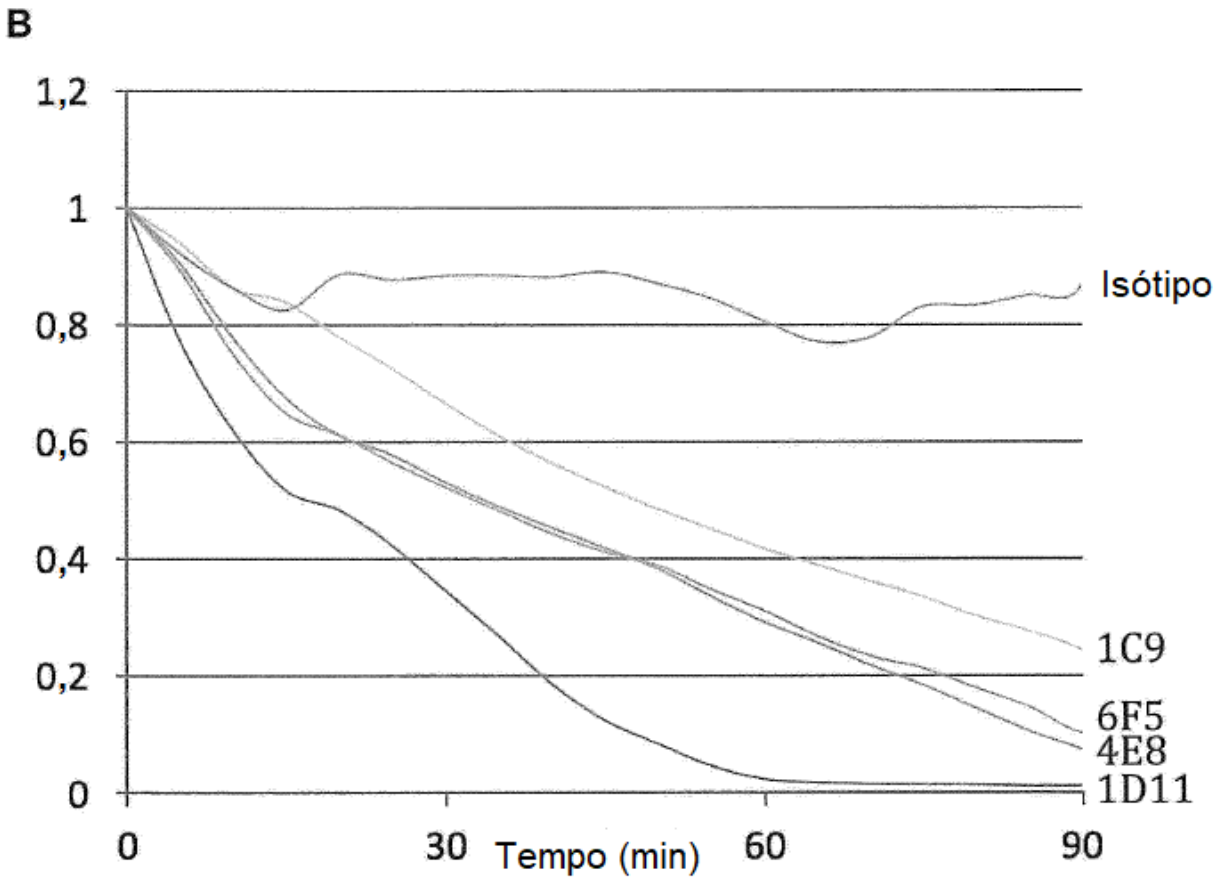


Fig. 10

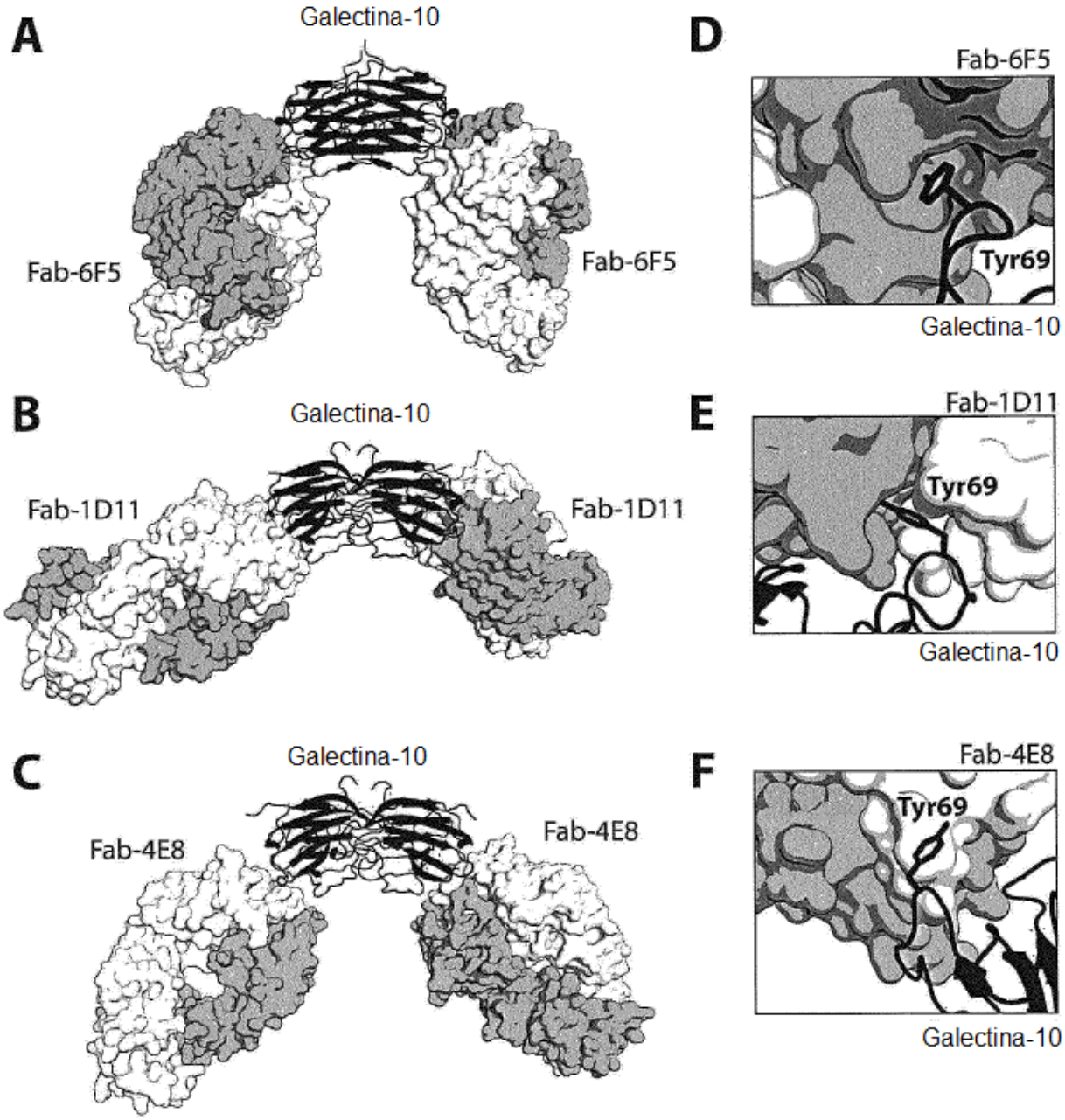

A
Galectina-10
Fab-6F5
Fab-6F5
B
Galectina-10
Fab-1D11
Fab-1D11
C
Galectina-10
Fab-4E8
Fab-4E8
D
Fab-6F5
Tyr69
Galectina-10
E
Fab-1D11
Tyr69
Galectina-10
F
Fab-4E8
Tyr69
Galectina-10

Fig. 11

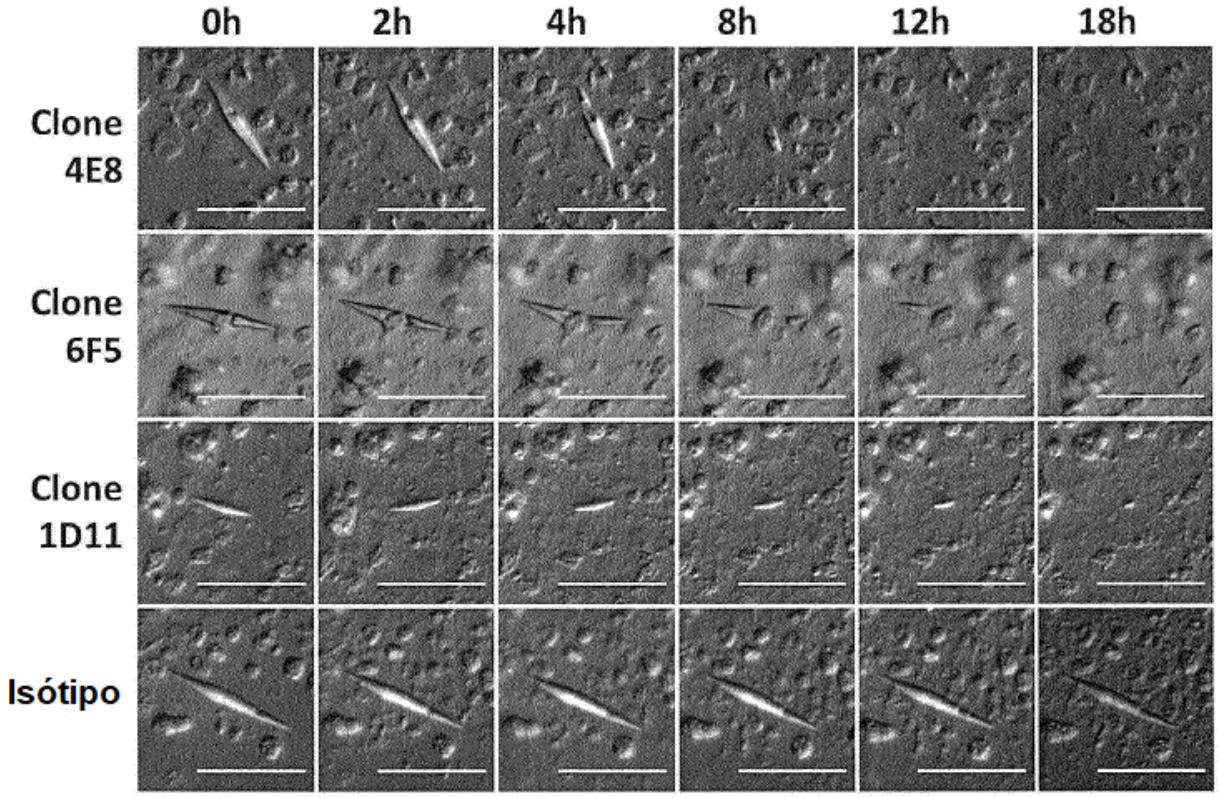
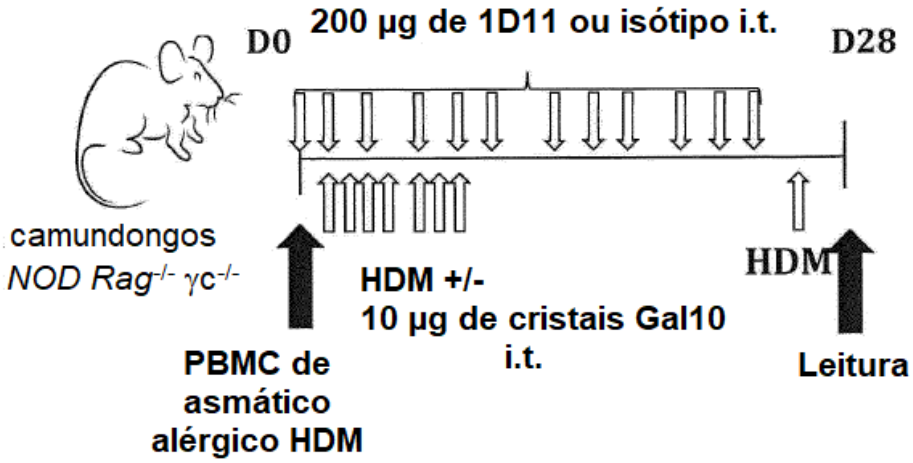
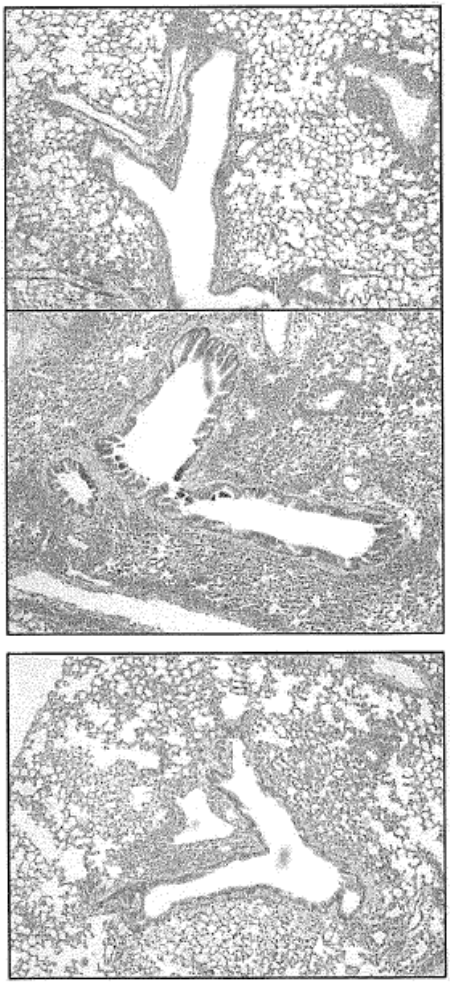


Fig. 12

A



B



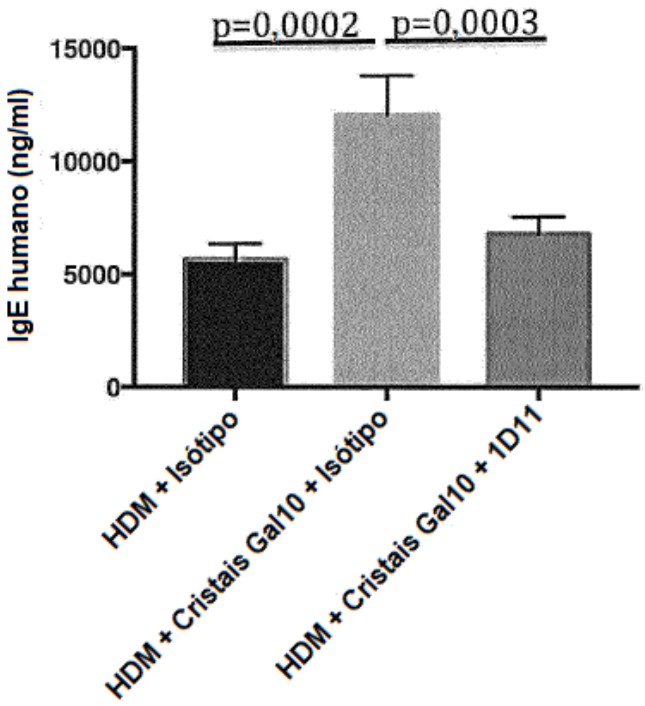
HDM + isótipo

HDM + Gal10^{cristais} + isótipo

HDM + Gal10^{cristais} + 1D11

Fig. 12 (continuação)

C



D

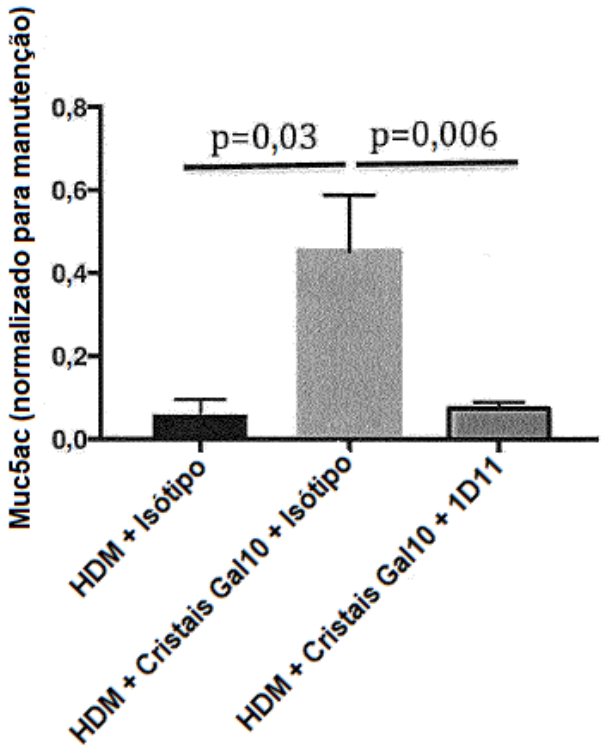
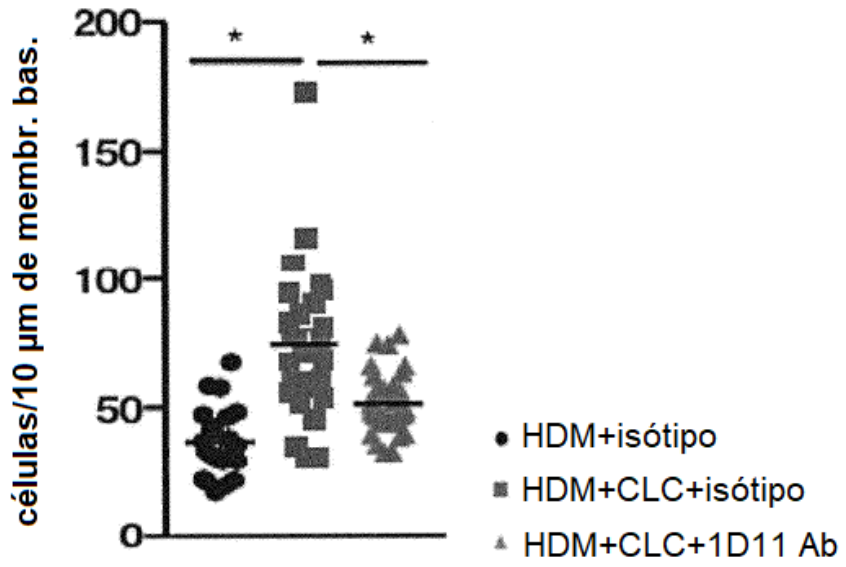


Fig. 12 (continuação)

E



F

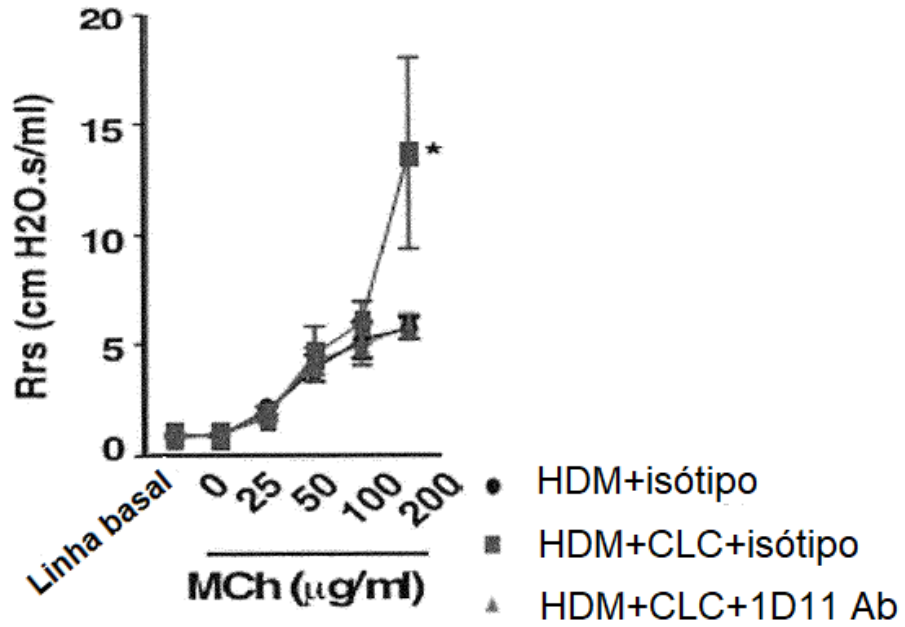


Fig. 13

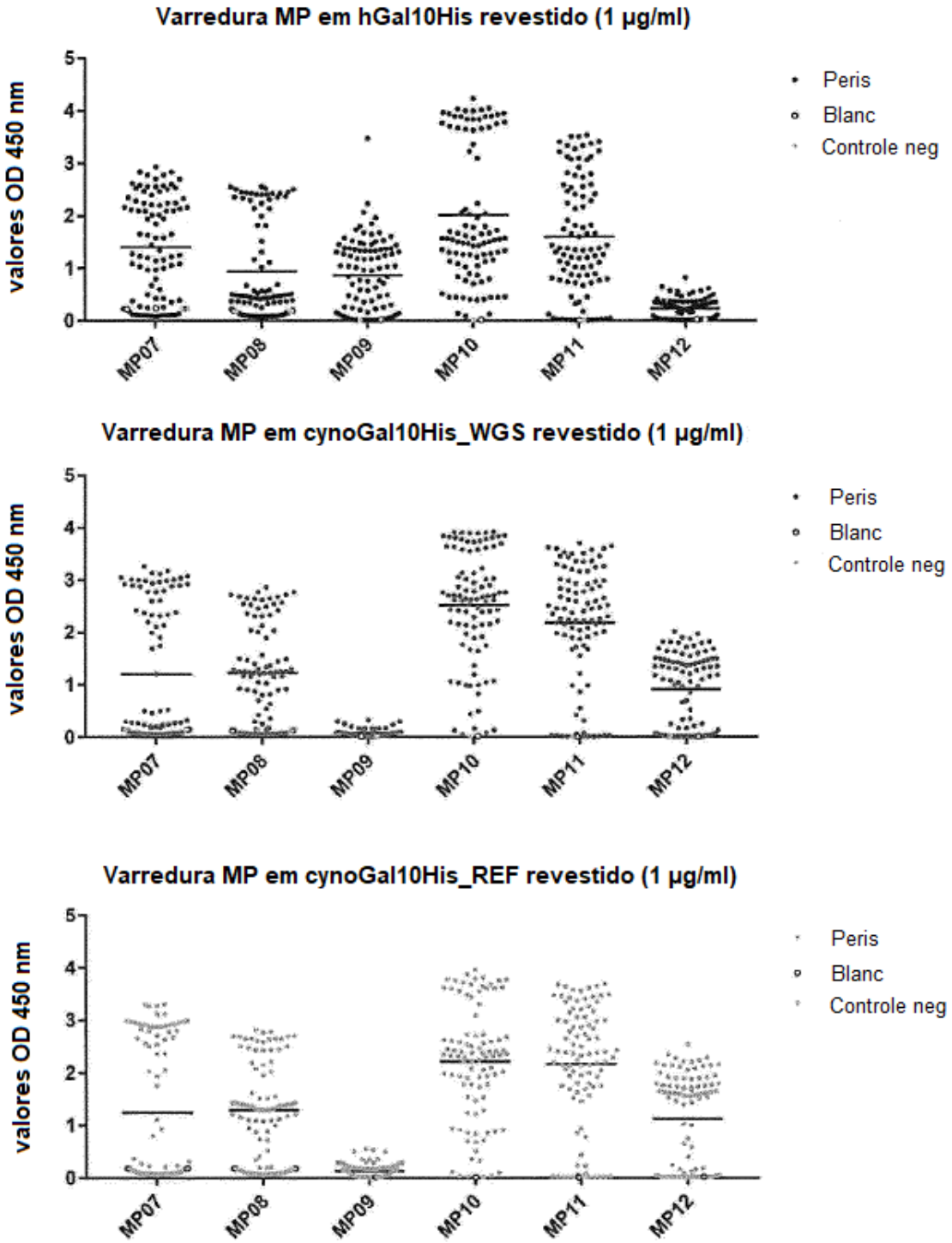

Varredura MP em hGal10His revestido (1 µg/ml)
valores OD 450 nm
0
1
2
3
4
5
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris
Blanc
Controle neg
Varredura MP em cynoGal10His_WGS revestido (1 µg/ml)
valores OD 450 nm
0
1
2
3
4
5
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris
Blanc
Controle neg
Varredura MP em cynoGal10His_REF revestido (1 µg/ml)
valores OD 450 nm
0
1
2
3
4
5
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris
Blanc
Controle neg

Fig. 14

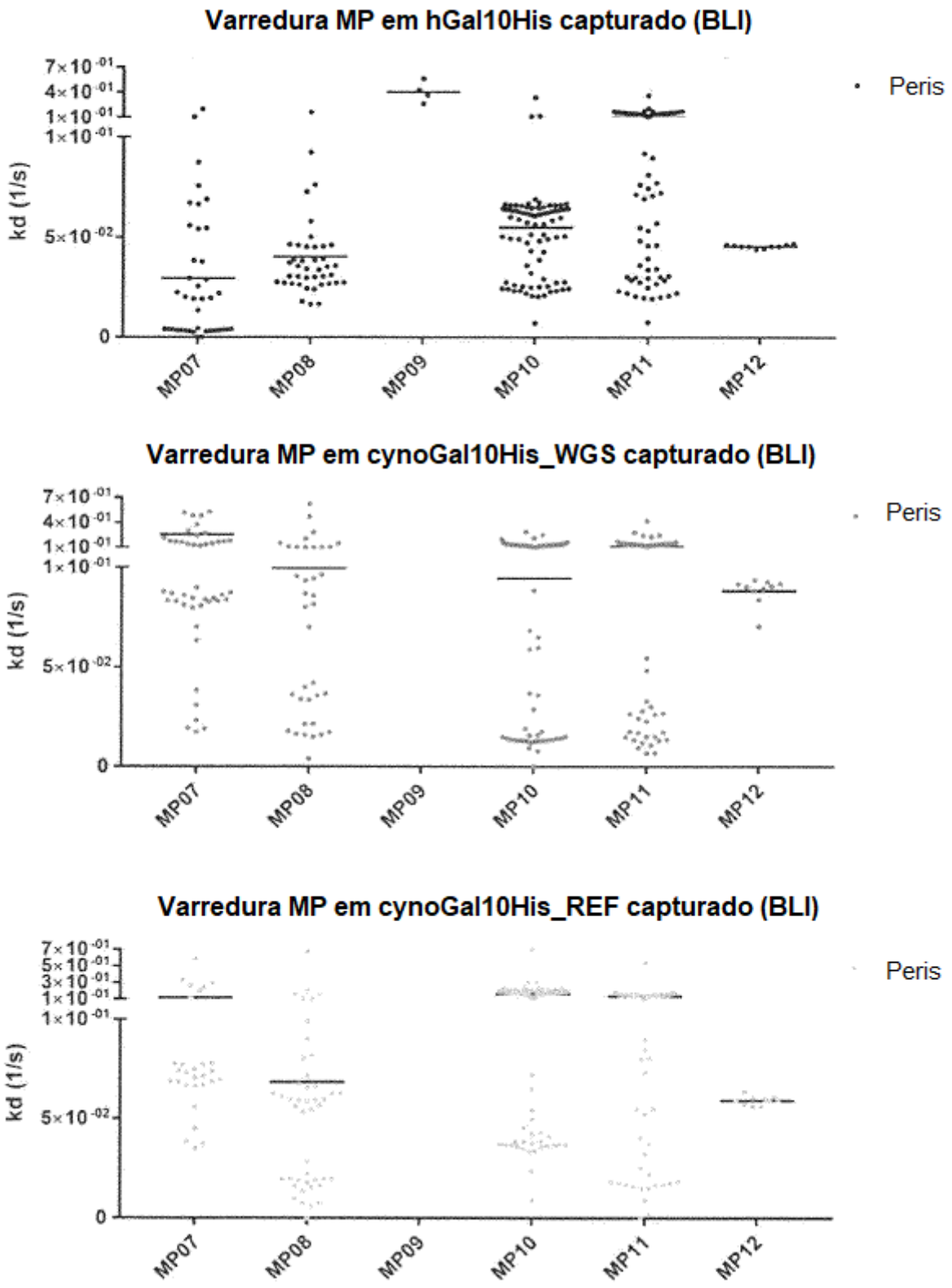

Varredura MP em hGal10His capturado (BLI)
kd (1/s)
7×10-01
4×10-01
1×10-01
1×10-01
5×10-02
0
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris
Varredura MP em cynoGal10His_WGS capturado (BLI)
kd (1/s)
7×10-01
4×10-01
1×10-01
1×10-01
5×10-02
0
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris
Varredura MP em cynoGal10His_REF capturado (BLI)
kd (1/s)
7×10-01
5×10-01
3×10-01
1×10-01
1×10-01
5×10-02
0
MP07
MP08
MP09
MP10
MP11
MP12
Peris

Fig. 15

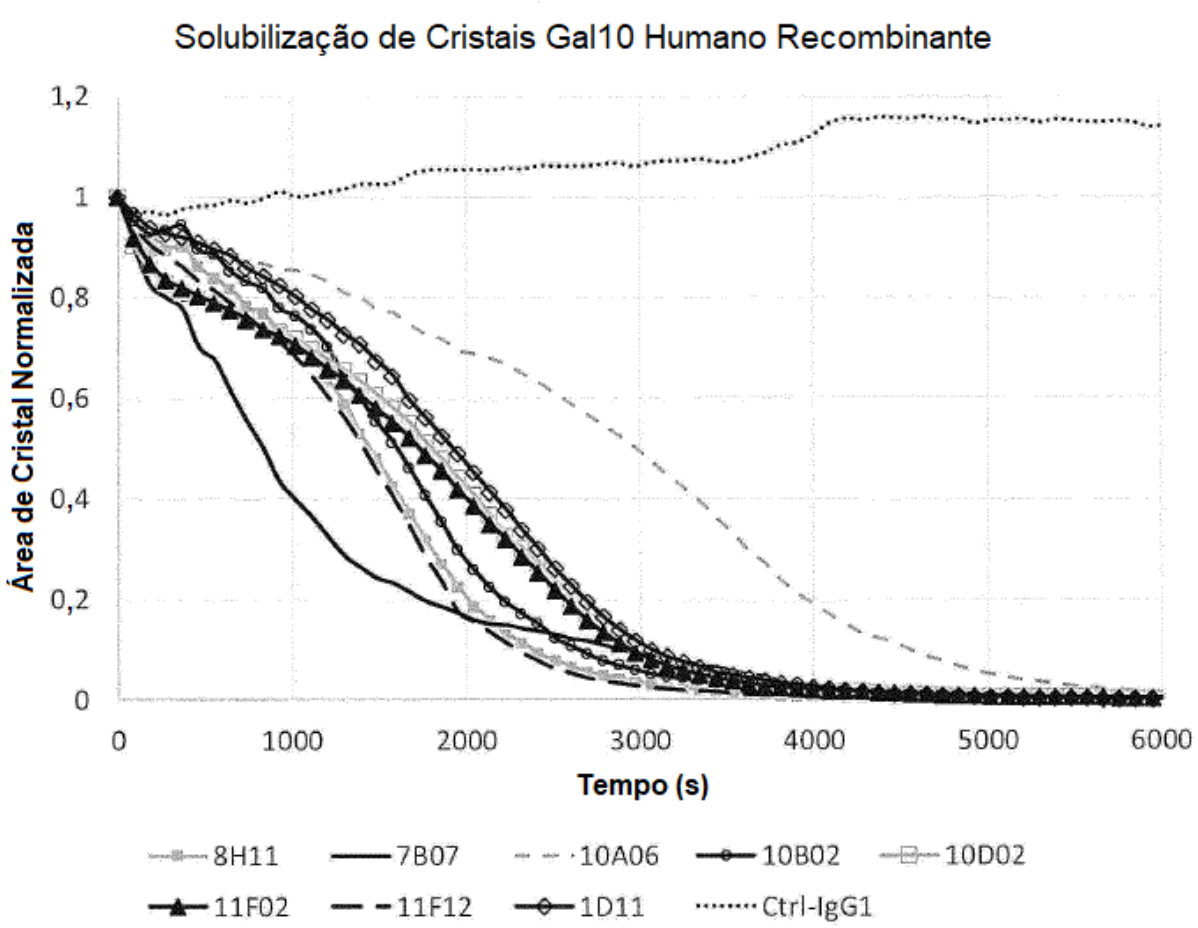

Solubilização de Cristais Gal10 Humano Recombinante
Área de Cristal Normalizada
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Tempo (s)
8H11
7B07
10A06
10B02
10D02
11F02
11F12
1D11
Ctrl-IgG1

Fig. 16

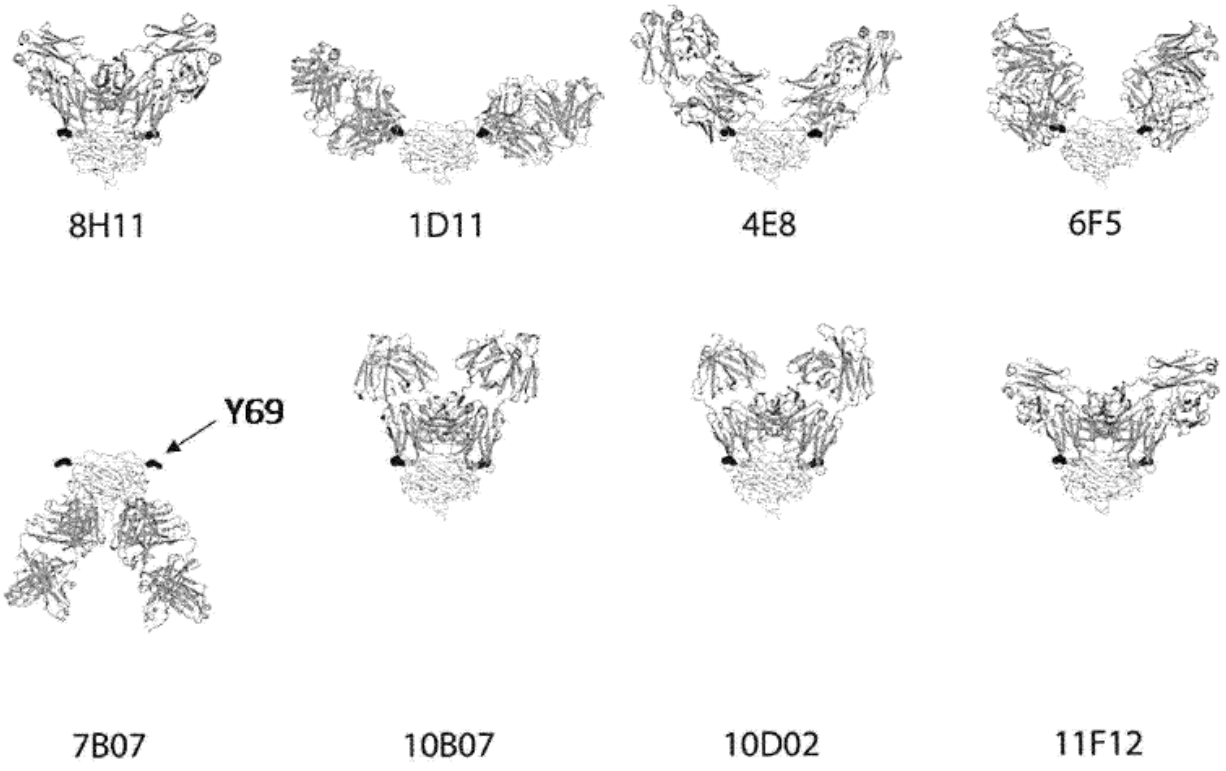


Fig. 17

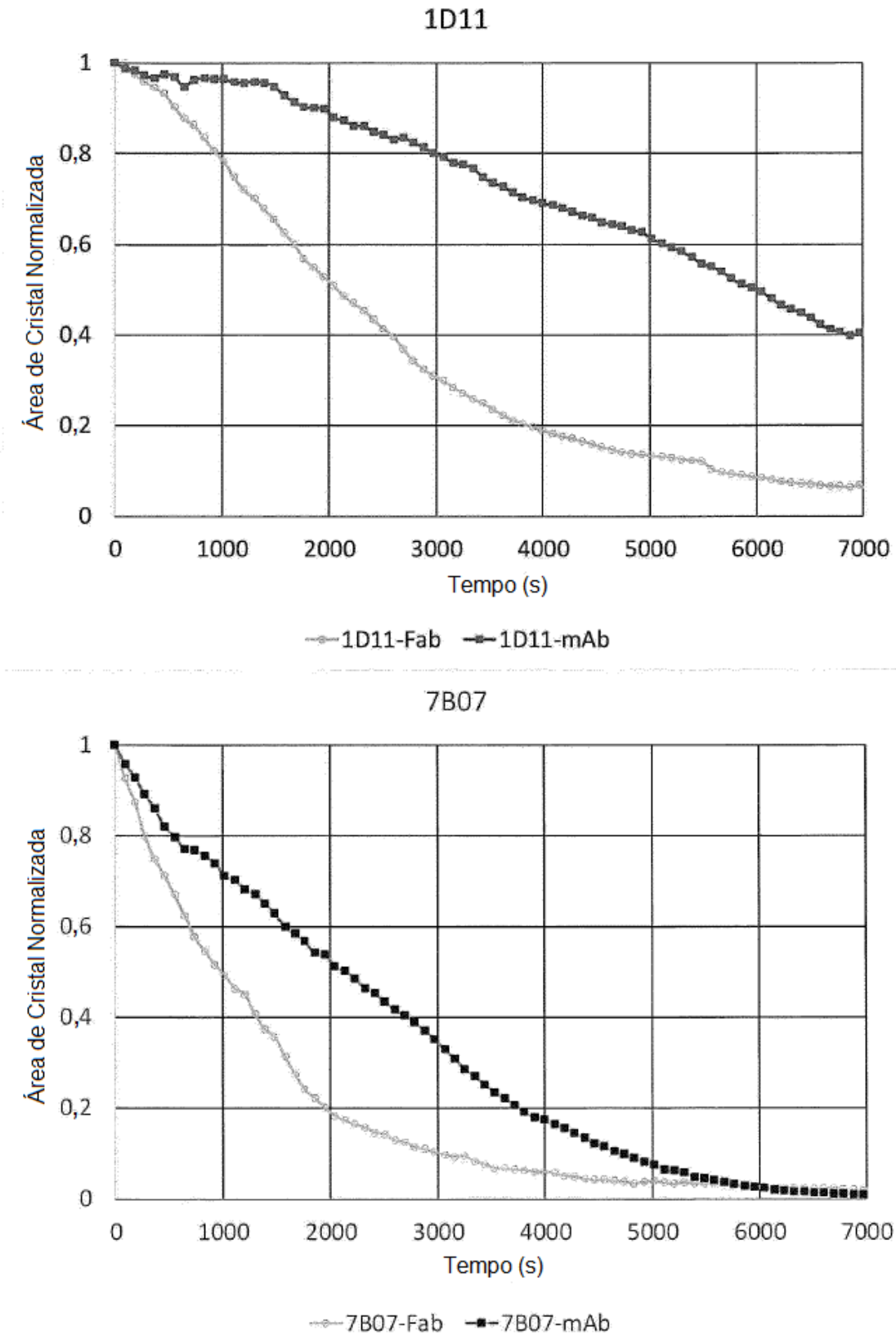
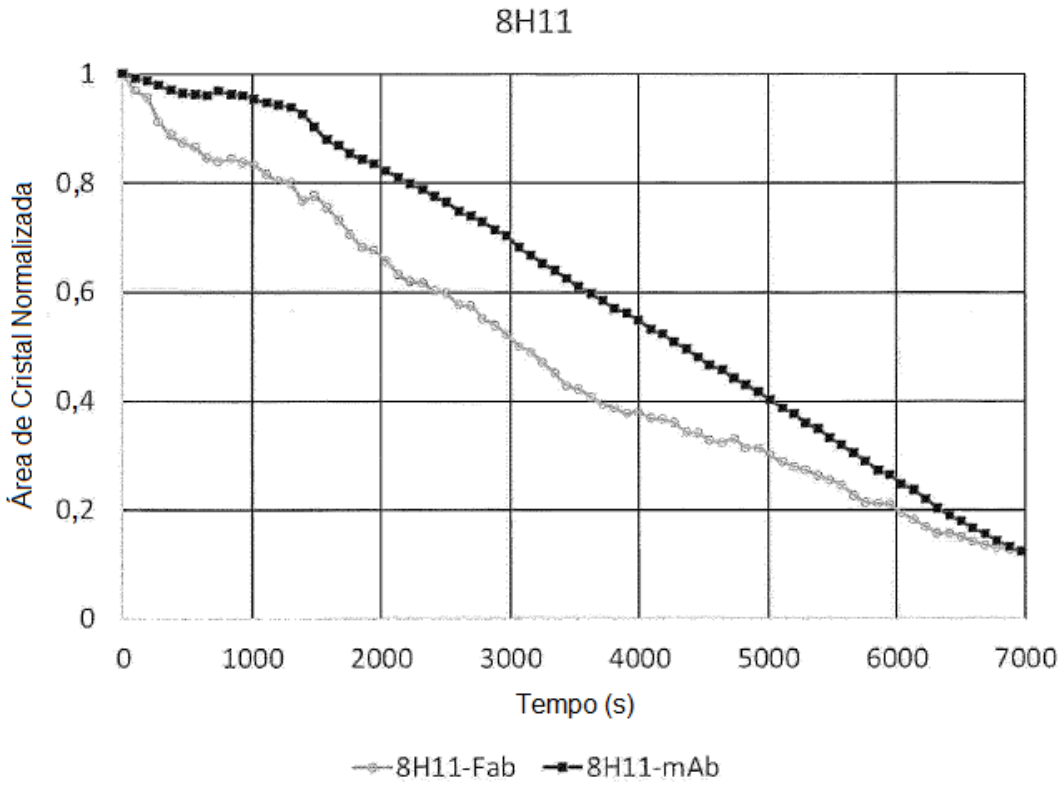

1D11
Área de Cristal Normalizada
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
Tempo (s)
1D11-Fab
1D11-mAb
7B07
Área de Cristal Normalizada
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
Tempo (s)
7B07-Fab
7B07-mAb

Fig. 17 (continuação)



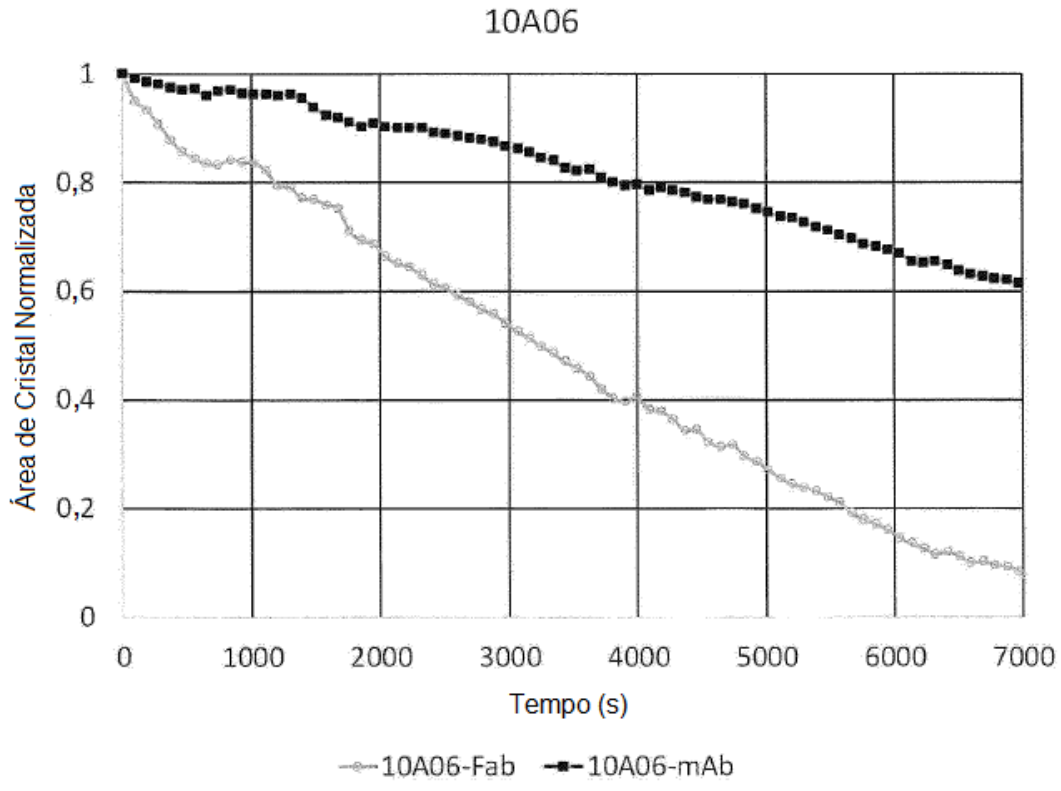
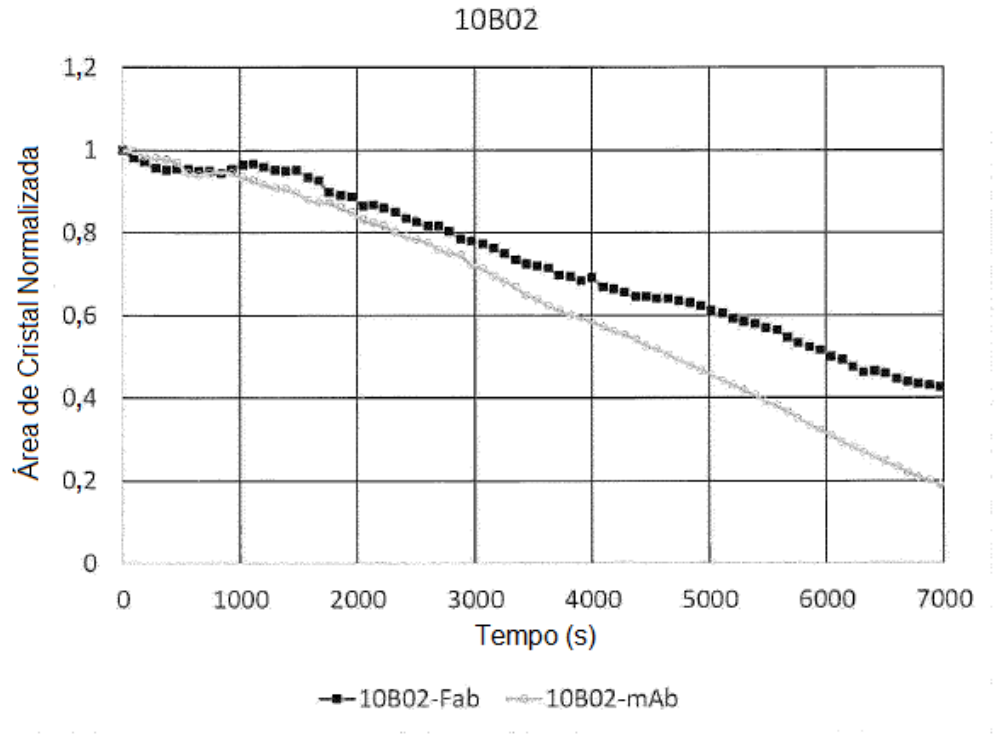


Fig. 17 (continuação)



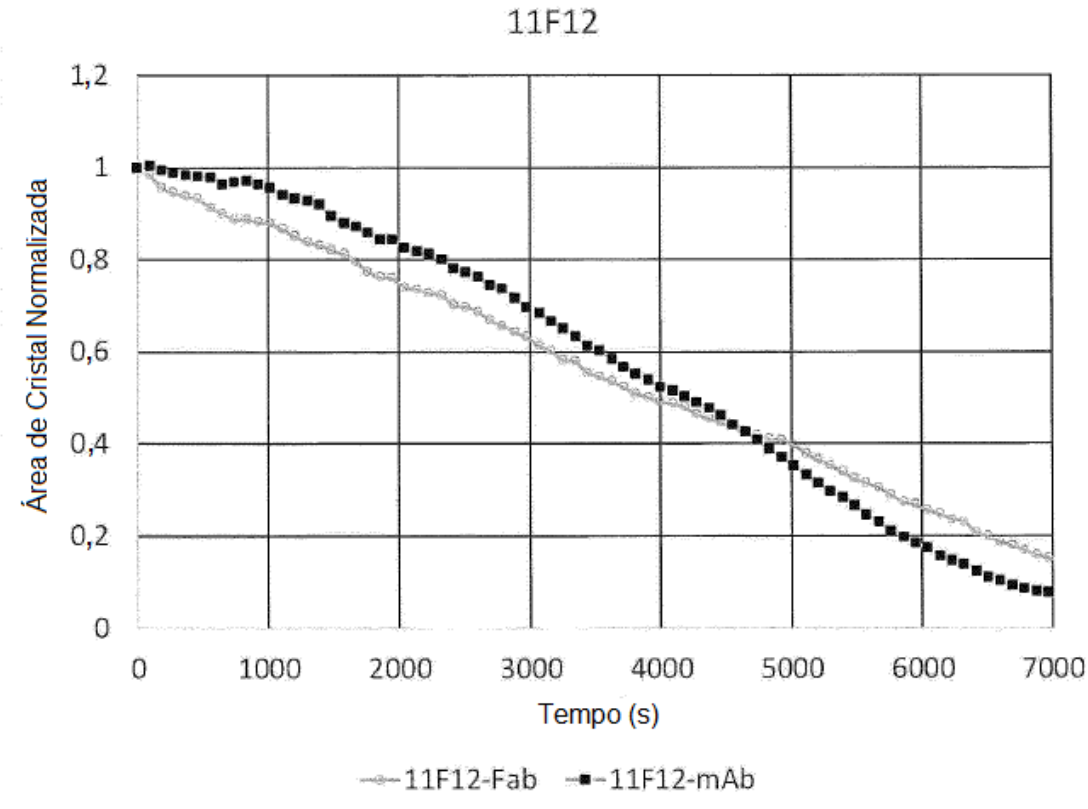
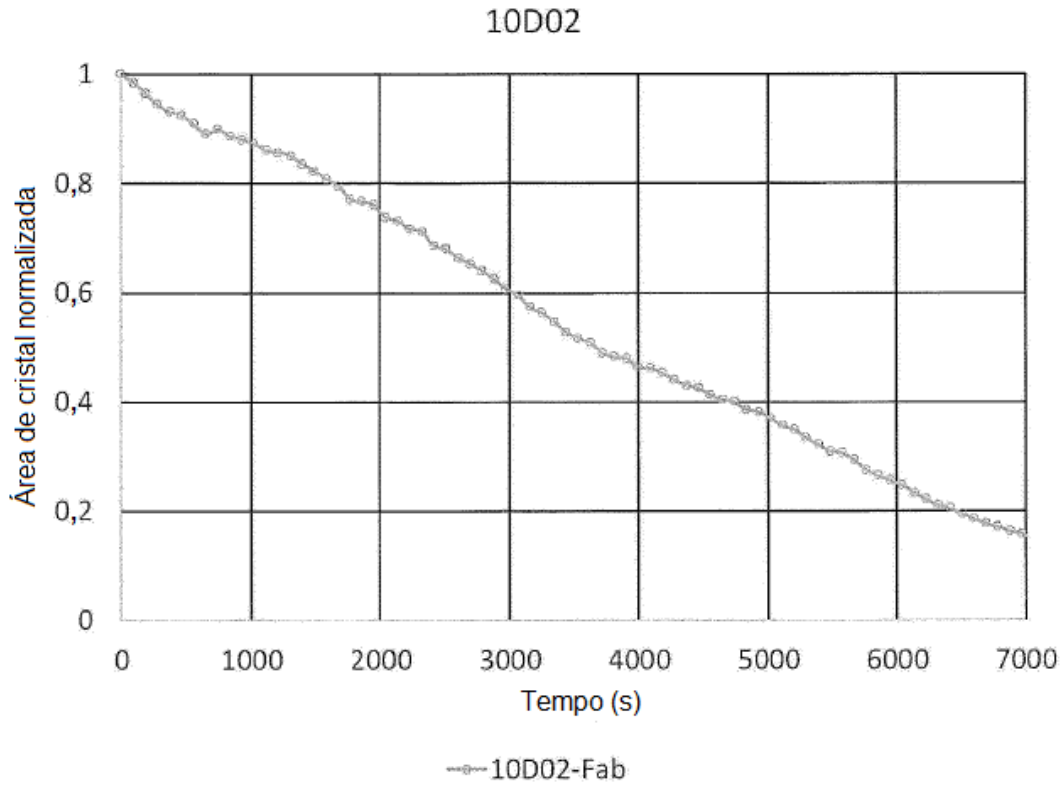


Fig. 17 (continuação)



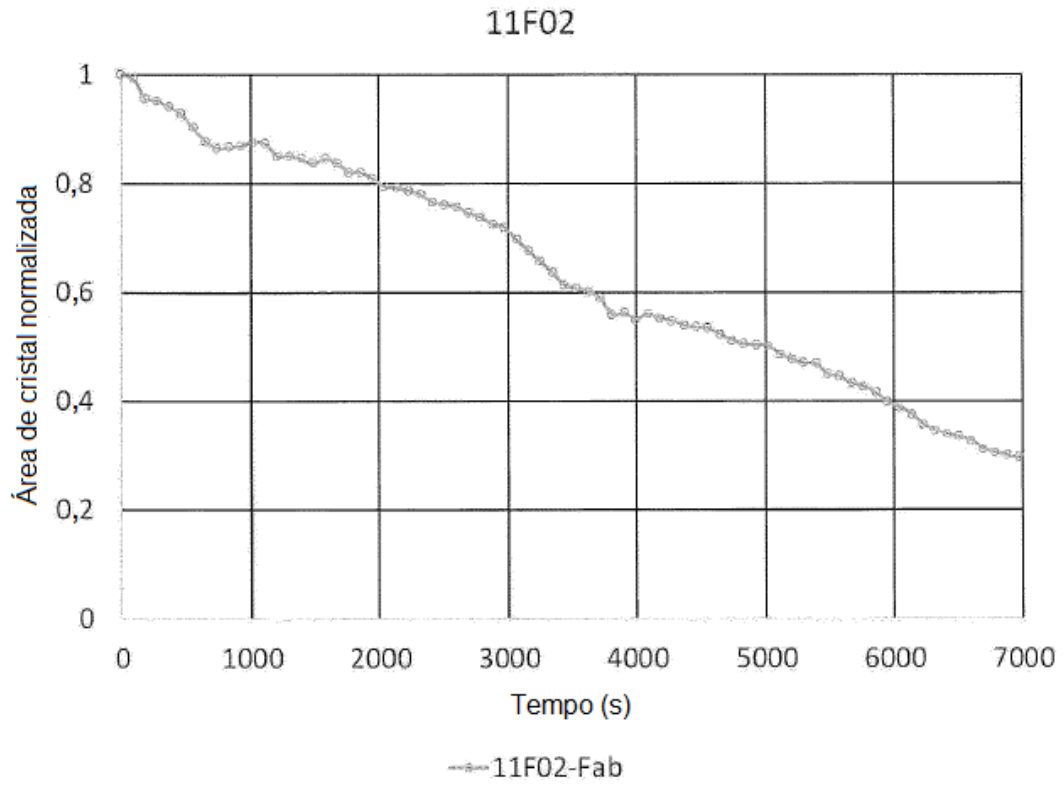


Fig.18

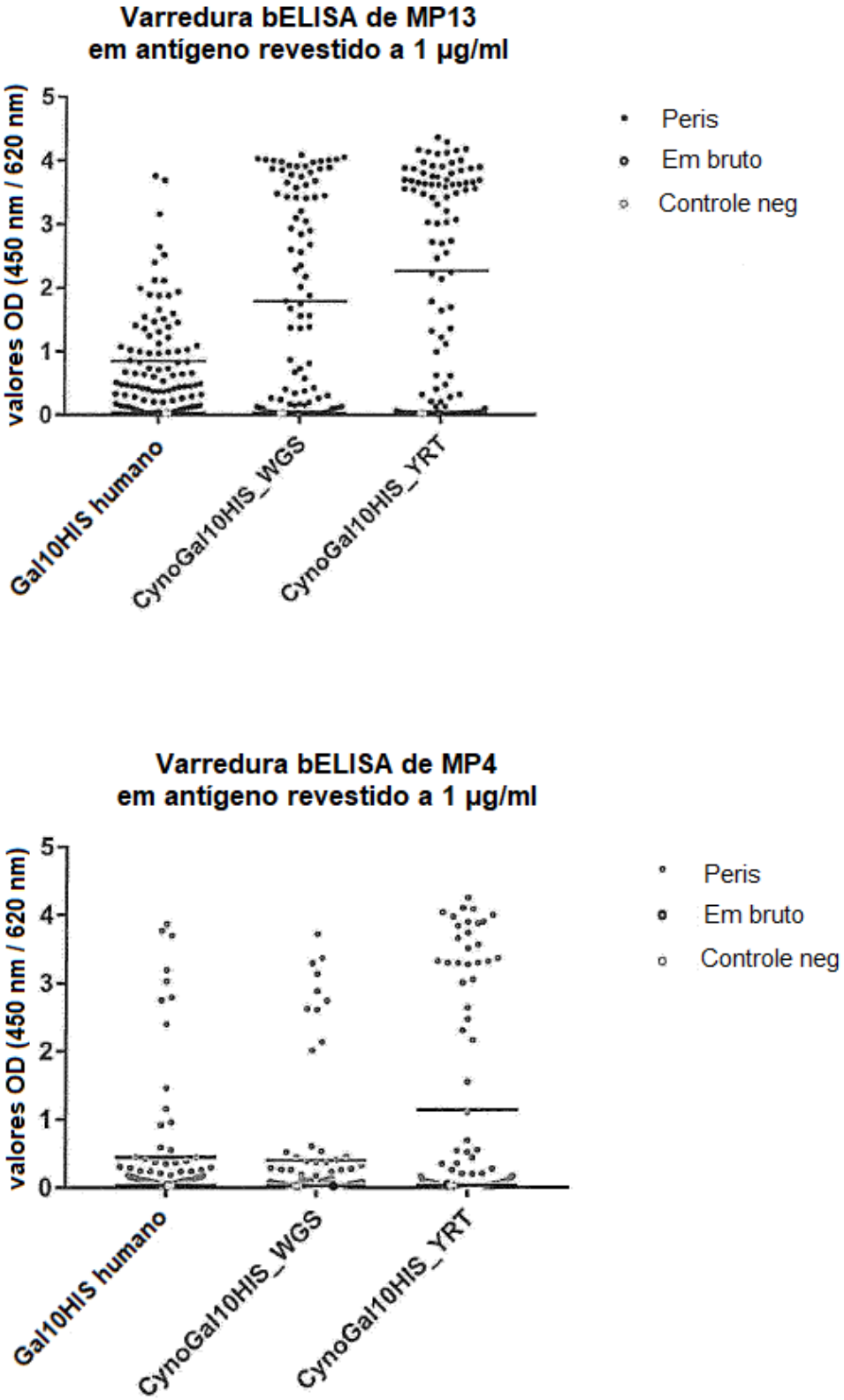

Varredura bELISA de MP13
em antígeno revestido a 1 µg/ml
valores OD (450 nm / 620 nm)
0
1
2
3
4
5
Gal10HIS humano
CynoGal10HIS_WGS
CynoGal10HIS_YRT
Peris
Em bruto
Controle neg
Varredura bELISA de MP4
em antígeno revestido a 1 µg/ml
valores OD (450 nm / 620 nm)
0
1
2
3
4
5
Gal10HIS humano
CynoGal10HIS_WGS
CynoGal10HIS_YRT
Peris
Em bruto
Controle neg

Fig. 19

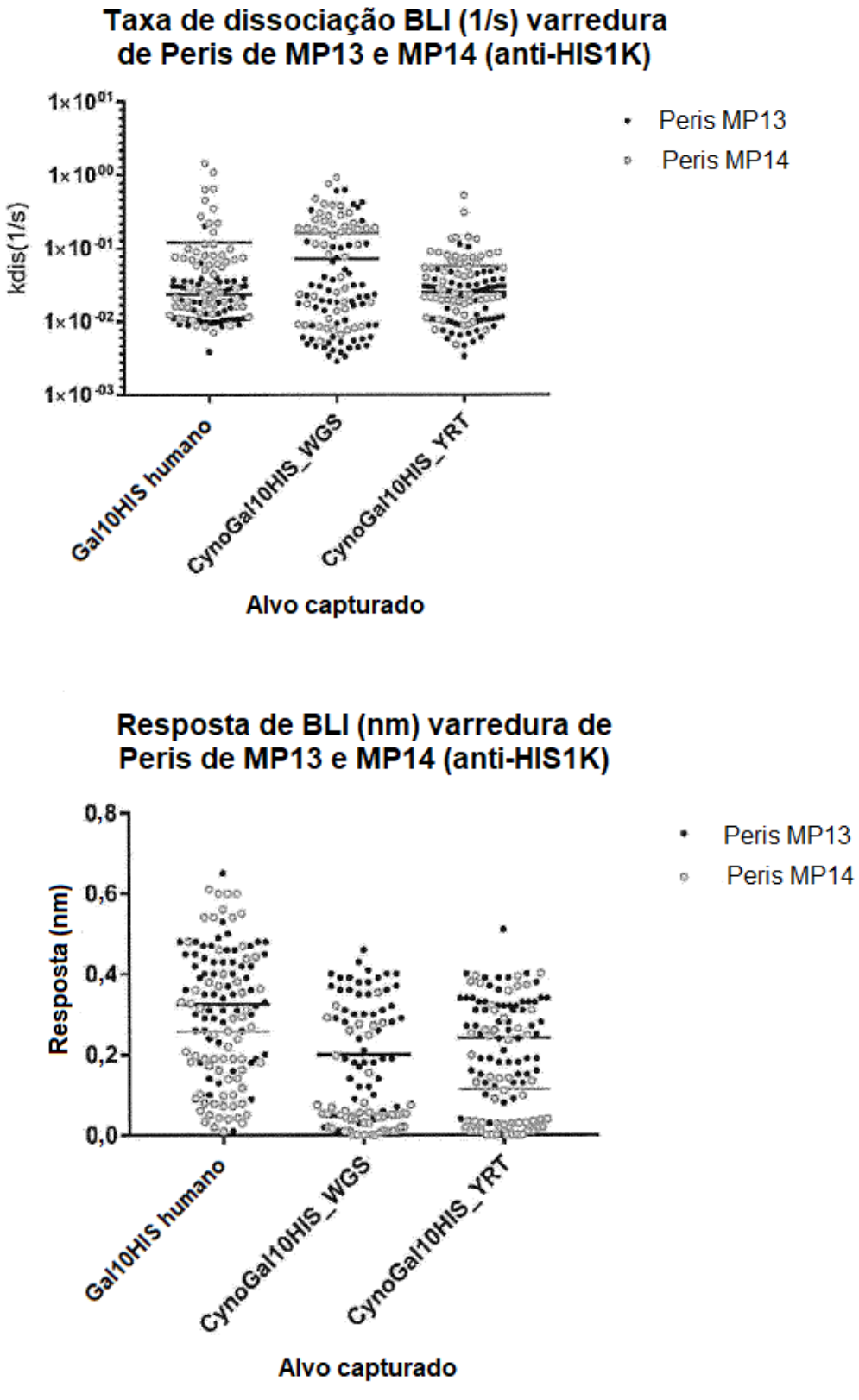
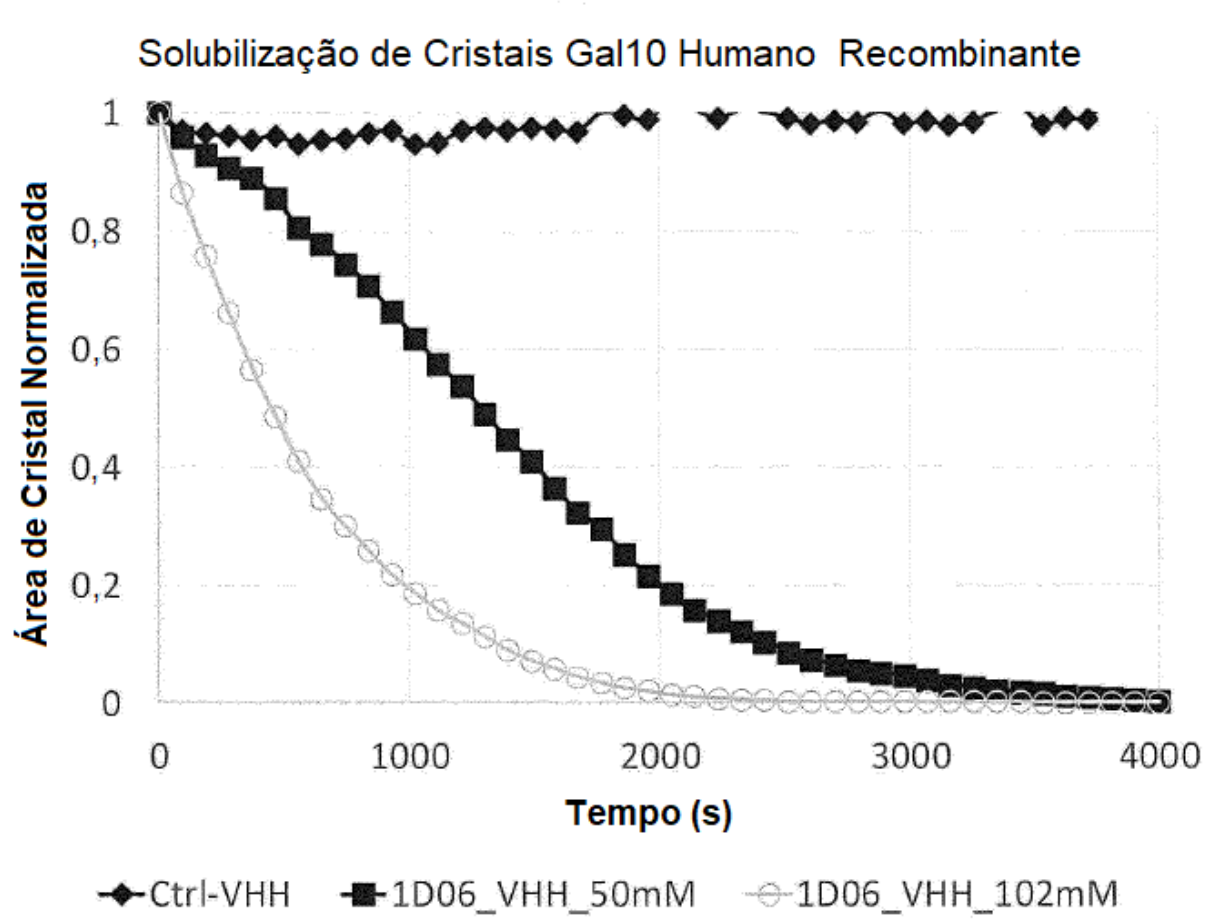

Taxa de dissociação BLI (1/s) varredura de Peris de MP13 e MP14 (anti-HIS1K)
kdis(1/s)
1x10^01
1x10^00
1x10^-01
1x10^-02
1x10^-03
Peris MP13
Peris MP14
Gal10HIS humano
CynoGal10HIS_WGS
CynoGal10HIS_YRT
Alvo capturado
Resposta de BLI (nm) varredura de Peris de MP13 e MP14 (anti-HIS1K)
Resposta (nm)
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Peris MP13
Peris MP14
Gal10HIS humano
CynoGal10HIS_WGS
CynoGal10HIS_YRT
Alvo capturado

Fig. 20


Solubilização de Cristais Gal10 Humano Recombinante
Área de Cristal Normalizada
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1000
2000
3000
4000
Tempo (s)
Ctrl-VHH
1D06_VHH_50mM
1D06_VHH_102mM

Resumo da Patente de Invenção para: **"ANTICORPOS DE GALECTINA-10"**

A presente invenção se refere a antagonistas, particularmente anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que se ligam à proteína galectina-10, particularmente galectina-10 humana. Os antagonistas da galectina-10 interrompem a cristalização da galectina-10 e são, portanto, úteis em métodos de prevenção e tratamento de doenças e condições em que a patologia está ligada à formação/presença de cristais de Charcot-Leyden (CLCs).

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências Corrigida B.02.026.PI-BR (RSA).
- Data de Geração do Código: 24/11/2020
- Hora de Geração do Código: 14:36:39
- Código de Controle:
  - Campo 1: AFBC51DBA156502A
  - Campo 2: 7A237677B047F01D