



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

(21) BR 112020016374-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/12/2020

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIRECIONAR CÉLULAS TREG

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 45/06; G01N 33/574; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 13/02/2018 US 62/630,084.

(71) Depositante(es): PRECISION BIOLOGICS, INC..

(72) Inventor(es): PHILIP M. ARLEN; KWONG-YOK TSANG; JUSTIN M. DAVID; MASSIMO FANTINI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019017870 de 13/02/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/160970 de 22/08/2019

(85) Data da Fase Nacional: 12/08/2020

(57) Resumo: O anticorpo NEO-201 é mostrado para se ligar às células Treg, e seu uso no direcionamento de células Treg é descrito. O NEO-201 pode ser usado para isolamento, detecção ou purificação de células Treg ativas e também para matar células Treg. São descritos métodos terapêuticos e terapias de combinação usando NEO-201 opcionalmente em combinação com outro agente.

FIG.1 Porcentagem de Tregs funcionais isoladas usando Kit<sup>1</sup> comercial ou com base na expressão<sup>2</sup> de NEO-201

Kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>int</sup> CD25 <sup>+</sup> Humanas EasySep™	Kit de Seleção Positiva de NEO-201 da Biotina Humana de Liberação EasySep™
67.14 <sup>a</sup>	99.12 <sup>#</sup>

Os resultados são expressos em % média de células NEO-201<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup> em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int</sup>FOXP3<sup>+</sup> (N=3)<sup>#</sup> de um doador

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIRECIONAR CÉLULAS TREG"**.

#### **REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO**

[001] O pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. 62/630.084, depositado em 13 de fevereiro de 2018, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

#### **INFORMAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIA**

[002] Este pedido inclui como parte de sua descrição uma listagem de sequência biológica no arquivo denominado "43282o4613.txt", criado em 13 de fevereiro de 2019, com um tamanho de 32.546 bytes, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

#### **ANTECEDENTES**

[003] Níveis elevados de células T regulatórias de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Tregs) têm sido relatados em neoplasias hematológicas (Beyer M et al. Blood 2005,106,2018; Motta M et al. Leukemia 2005,19:1788; Yang ZZ et al. Blood, 2006, 107:3639) e em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas (Woo et al. Cancer Res 2001, 61:4766), melanoma maligno (Javia et al. J Immunother. 2003, 26:85), neoplasias gastrointestinais (Sasada et al. Cancer, 2003:98:1089), câncer de ovário (Curiel JT et al. Nat Med 2004, 10:942), carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Schaefer et al. Br.J.Cancer 2005, 92:913), carcinoma hepatocelular (Ormandy LA et al. Cancer Res, 2005:2457), câncer de mama (Liyanage UY et al. J Immunol, 2002, 169:2756), cancro pancreático (Liyanage UY et al. J Immunol, 2002, 169:2756), mesotelioma (DeLong P, et al. Cancer Bio Ther 2006, 4:342), carcinoma de células renais metastático (Dannull J et al. J Clin Invest, 2005, 115:3623) e câncer de próstata (Vergati M et al. Cancer Immunol Immunother. 2011, 60:197). Esse aumento foi demonstrado no

microambiente tumoral e no sangue periférico. Um estudo recente (Miller AM, et al. J Immunol 2066, 177: 7398) relatou níveis elevados de Tregs no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata após prostatectomia e mostraram *in vitro* a função imunossupressora dessas Tregs.

[004] Estudos clínicos em pacientes com melanoma mostraram que as Tregs podem inibir as respostas de células T específicas de antígeno e inespecíficas (Mukhetji B.J Exp Med. 1989, 169:1961; Chakraborty NG et al. J Immunol 1990, 145:2359). Em pacientes com câncer de ovário, uma correlação direta foi demonstrada entre Tregs infiltradas em tumores e sobrevida global (Curiel JT et al. Nat Med 2004, 10:942). Nesses pacientes, o tratamento com DAB<sub>389</sub>IL2 conjugado à toxina da difteria recombinante interleucina 2 (denileucina diftotox, ONTAK) levou à depleção de Tregs e melhorou a resposta antitumoral (Barnett B et al. Am J Reprod Immunol 2005, 54:369). Denileucina diftotox (DAB<sub>389</sub>IL-2, ONTAK) é uma proteína de fusão da IL-2 humana e os domínios enzimaticamente ativos e translocadores de membrana da toxina da difteria. Liga-se preferencialmente a células que expressam IL-2R de alta afinidade, consistindo em CD25 (IL-2R $\alpha$ ), CD122 (IL-2R $\beta$ ) e CD132 ( $\gamma_c$ ). Após a ligação à IL-2R, a denileucina diftotox é internalizada por endocitose e inibe a síntese de proteínas, levando à morte celular. Também foi demonstrado que a denileucina diftotox reduz significativamente o número de Tregs no sangue periférico de pacientes com carcinoma de células renais metastático e revoga a imunossupressão mediada por Tregs *in vivo* (Dannull J et al. J Clin Invest, 2005, 115: 3623).

[005] Em resumo, foi demonstrado que as células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> podem reduzir a eficácia dos protocolos imunoterapêuticos e a depleção dessas células pode melhorar as respostas imunes antitumorais medicamentosas da vacina e a

sobrevida global (Dannull J et al. J Clin Invest, 2005, 115: 3623; Vergati M et al. Cancer Immunol Immunother. 2011, 60:197; Antony PA, et al. J Immunother 2002, 25:202).

[006] O câncer representa uma das causas mais frequentes de mortalidade em todo o mundo, com uma estimativa de vinte milhões de novos casos esperados anualmente em 2025 (Ferlay *et al.*, 2015). Os métodos convencionais de tratamento do câncer, como cirurgia, radiação e quimioterapia, muitas vezes provocam efeitos colaterais graves, mas não conseguem curar a maioria dos pacientes com doença avançada, levando à recaída (Bodey *et al.*, 1996). Modalidades de tratamento mais recentes foram desenvolvidas para atingir seletivamente células cancerígenas, poupando amplamente tecidos saudáveis normais. Entre eles, a imunoterapia tornou-se uma importante opção de tratamento para pacientes com câncer, pois revoluciona o campo da medicina contra o câncer.

[007] Um princípio subjacente à imunoterapia contra o câncer é conhecido como imunoedição (Mittal *et al.*, 2014), que é um mecanismo extrínseco de supressão do câncer que se inicia apenas após a transformação celular ter ocorrido e os mecanismos intrínsecos da supressão do câncer falharem. O processo imunológico ocorre em três fases; eliminação, equilíbrio e fuga. Durante as fases de eliminação e equilíbrio, respectivamente, a rejeição imunológica das células cancerígenas predomina ou se equilibra com a proliferação de células cancerígenas para controlar o crescimento maligno. Na fase de escape, no entanto, as células cancerígenas mantidas sob controle podem escapar do reconhecimento imunológico devido à insensibilidade aos mecanismos efetores imunológicos e/ou indução da supressão imunológica no microambiente tumoral. As células cancerígenas que escapam ao reconhecimento imunológico são capazes de proliferar mais livremente e se transformar em doença clinicamente aparente

(Dunn *et al.*, 2004). O objetivo da imunoterapia contra o câncer é manter as células cancerígenas na fase de eliminação e/ou equilíbrio, gerando e/ou ampliando respostas imunes antitumorais para neutralizar o crescimento do tumor, retardar a recorrência do tumor e prolongar a sobrevida (Carter, 2001; Hodge *et al.*, 2006; Vergati *et al.*, 2010; Gabitzsch *et al.*, 2015). As abordagens terapêuticas incluem o tratamento de pacientes com anticorpos inibitórios do ponto de verificação, vacinas antitumorais e células receptoras de antígeno quimérico (CAR)-T, as quais alavancam a imunidade adaptativa pelas células T. No entanto, a imunidade inata também pode gerar e potencializar respostas antitumorais, e os anticorpos monoclonais direcionados ao tumor (mAbs) podem ser usados para estimular a imunidade antitumoral inata (Topalian *et al.*, 2011).

[008] O NEO-201 é um novo mAb IgG1 humanizado que foi gerado contra a plataforma vacinal de câncer colorretal alogênico de Hollinshead (Hollinshead *et al.*, 1970; Hollinshead *et al.*, 1972). Os componentes imunogênicos desta vacina foram antígenos associados a tumores (TAAs) derivados de frações da membrana tumoral reunidos a partir de amostras ressecadas cirurgicamente de 79 pacientes com câncer de cólon (Hollinshead *et al.*, 1985). Essas frações de membrana foram semi-purificadas, pesquisadas quanto à hipersensibilidade tardia (DTH) em pacientes com câncer de cólon versus voluntários saudáveis e avaliadas em ensaios clínicos em pacientes com câncer colorretal refratário (Hollinshead *et al.*, 1985; Hollinshead, US4810781, 1989; Bristol & Kantor, Patente U.S. 7829678, 2010). Esses ensaios relataram benefício clínico, definido pela resposta antitumoral e prolongamento significativo da sobrevida global em pacientes que desenvolveram uma resposta IgG sustentada, além de uma resposta mediada por células contra a vacina, sugerindo que a vacina continha componentes imunogênicos capazes de gerar anticorpos antitumorais (Hollinshead,

1991). Esta vacina original contra o câncer colorretal foi usada para gerar anticorpos monoclonais em camundongos, produzindo o ensituximabe descrito anteriormente (NPC-1C/NEO-102) (Luka *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2013; Beg *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017) e NEO-201. Trabalhos anteriores indicaram que o NEO-201 se liga a variantes associadas a tumores de membros da família CEACAM, particularmente variantes associadas a câncer de CEACAM5 e CEACAM6 (Zeligs *et al.*, 2017).

[009] A família do antígeno carcinoembrionário humano (CEA) é composta por 29 genes dispostos em conjunto no cromossomo 19q13.2. Com base nas homologias de nucleotídeos, esses genes são classificados em duas subfamílias principais, o CEACAM e os subgrupos de glicoproteínas específicas da gravidez. As proteínas codificadas por CEACAM incluem CEA (CEACAM5), moléculas de adesão celular relacionadas a CEA (CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7 e CEACAM8). A família CEACAM pertence à superfamília Igura Estruturalmente, cada um dos CEACAMs humanos contém um domínio N-terminal que inclui 108-110 aminoácidos e é homólogo aos domínios variáveis da Ig, seguido por um número diferente (zero a seis) de domínios constantes do tipo Ig C2. As proteínas CEACAM podem interagir homofilicamente e heterofilicamente entre si. O CEACAM1 é uma proteína única dentro desta família porque contém um ITIM (motivo inibitório à base de tirosina imunoreceptora) como PD1 em seu domínio citoplasmático. Este efeito inibitório é desencadeado pela fosforilação de resíduos de tirosina com o ITIM, o que resulta no recrutamento de tirosina fosfatase-1 e -2 contendo domínio da homologia Src 2 que contém Src. A proteína CEACAM1 é expressa em uma variedade de células imunes, incluindo monócitos, granulócitos, células T ativadas, células B e células NK. O CEACAM1 ocorre como várias isoformas, as duas principais sendo

CEACAM1-L e CEACAM1-S que possuem domínios citoplasmáticos longos (L) ou curtos (S), respectivamente. A expressão de CEACAM1-S é totalmente inexistente em leucócitos humanos. O CEACAM1-L é expresso na subpopulação de células NK humanas ativadas que são negativas para CD16, mas positivas para CD56.

[0010] Os anticorpos monoclonais (mAbs) consistem em uma região única de ligação ao antígeno (fragmento de ligação ao antígeno, Fab) que é específica para um determinado mAb e em uma região constante (fragmento cristalizável, Fc) que é comum a todos os mAbs do mesmo isótipo. A região Fc é capaz de modular a atividade das células imunes ao se envolver com membros da família do receptor Fc (FcR) expressos na superfície de tipos específicos de células imunes. Em particular, os mAbs de IgG1 humanos podem interagir com o receptor gama Fc IIIa (Fc $\gamma$ RIIIa, CD16) expresso em macrófagos e células NK. Essa interação pode estimular os macrófagos a fagocitar as células cancerígenas opsonizadas com mAb e pode ativar as células NK para desgranular e lisar as células cancerígenas através de um mecanismo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). ADCC demonstrou ser um mediador chave dos efeitos antitumorais *in vivo* em muitos estudos pré-clínicos e desempenha um papel importante no mecanismo de ação de vários mAbs usados na terapia do câncer (Seidel *et al.*, 2013). Exemplos de mAbs clinicamente aprovados, que podem mediar ADCC, incluem trastuzumabe, que direciona receptor HER2 para câncer de mama (Seidel *et al.*, 2013; Petricevic *et al.*, 2013); rituximabe, que direciona o marcador de células pan-B CD20 para linfoma (Seidel *et al.*, 2013; Dall'Ozzo *et al.*, 2004); cetuximabe, que direciona o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para câncer colorretal e de cabeça e pescoço (Seidel *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2007; Lopez-Albaitero *et al.*, 2009); e avelumabe, que direciona o ligando

imunossupressor PD-L1 para carcinoma de células Merckel e câncer de bexiga (Boyerinas *et al.*, 2015). Além disso, a região Fc pode potencialmente interagir com o complexo C1 para ativar a citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC), na qual uma cascata proteolítica culmina na formação de poros na membrana plasmática que causam a lise das células direcionadas pelo anticorpo. Mesmo nos casos em que a CDC antitumoral foi demonstrada *in vitro*, há controvérsia se é crucial para a eficácia clínica da terapia com mAb no câncer (Meyer *et al.*, 2014).

[0011] As Patentes U.S. anteriores do requerente 5.688.657, 7.314.622, 7.491.801, 7.763.720, 7.829.678, 8.470.326, 8.524.456, 8.535.667, 8.802.090, 9.034.588, 9.068.014, 9.371.375, 9.592.290, 9.718.866, incorporadas em cada uma delas por referência e RE39.760, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade, divulga vários anticorpos anticâncer, antígenos do câncer e tecnologias relacionadas.

### **BREVE DESCRIÇÃO**

[0012] Mostramos anteriormente que o NEO-201 se liga a variantes de CEACAM5 e CEACAM6 associadas ao câncer, especificamente por meio de uma variante de glicosilação associada a câncer dessas proteínas. O NEO-201 é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado que foi derivado de uma preparação imunogênica de antígenos associados a tumores a partir de extratos de tecido de tumor de cólon alogênico reunidos. O NEO-201 é reativo contra a maioria dos tecidos tumorais de muitos carcinomas diferentes, mas não é reativo para a maioria dos tecidos normais. A análise funcional revelou que o NEO-201 é capaz de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) contra células tumorais. Estudos anteriores demonstraram que o NEO-201 atenua o crescimento de xenoinxertos de tumores humanos em

camundongos e demonstra segurança e tolerabilidade em primatas não humanos, com uma diminuição transitória nos neutrófilos circulantes, sendo o único efeito adverso observado.

[0013] Os requerentes mostraram aqui que o NEO-201 se liga a células Treg e, portanto, pode ser usado para purificação de células Treg, por exemplo, células Treg ativas, e também para matar células Treg. Esses resultados foram particularmente inesperados, pois acredita-se que os antígenos NEO-201 (variantes glicosiladas do CEACAM5 e CEACAM6) associados ao câncer não sejam expressos pelas células Treg. Com base nesses resultados, a natureza do antígeno NEO-201 está sendo reavaliada. Sem intenção de ser limitado pela teoria, acredita-se que as células Treg possam expressar uma ou mais proteínas na superfície celular com glicosilação igual ou semelhante à glicosilação associada ao câncer de CEACAM 5/6 que constitui o antígeno NEO-201.

[0014] A infiltração de células Treg tem sido associada a vários tipos de câncer, e vários estudos demonstraram a ablação seletiva de células Treg para promover respostas imunes ao câncer. A capacidade recentemente descrita do NEO-201 de matar células Treg apoia o uso do NEO-201 para potencializar respostas imunes ao câncer, independentemente da expressão do antígeno NEO-201 pelo próprio câncer. Por exemplo, espera-se que o NEO-201 potencialize as respostas imunes antitumorais medicamentosas à vacina. O uso do NEO-201 para eliminar seletivamente as células Treg pode ser benéfico em outras doenças nas quais se acredita ou se suspeita que as células Treg desempenhem um papel, incluindo condições neurodegenerativas (como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e esclerose múltipla (MS)).

[0015] Além disso, a ligação NEO-201 pode ser usada para purificação de células Treg, seja para pesquisa ou uso terapêutico. A

função supressora defeituosa das Tregs humanas parece ser uma característica comum de doenças e condições autoimunes. A purificação das células Treg pode ter utilidade diagnóstica e/ou terapêutica. Por exemplo, células Treg purificadas de um doador saudável podem ser transplantadas para um indivíduo com uma condição autoimune, a fim de tratar essa condição. Além disso, Tregs autólogas ou heterólogas purificadas podem ser engenheiradas e introduzidas em um paciente para o tratamento de uma doença autoimune.

[0016] Os exemplos de trabalho descrevem experimentos conduzidos usando PBMCs de doadores normais para análise fenotípica e funcional. Os kits de isolamento EasySep™ StemCell Treg e kits antibiotina foram utilizados com reagentes de purificação Treg fornecidos pelo fabricante ou personalizados usando o mAb NEO-201 marcado com biotina para isolar Tregs de PBMCs. A análise fenotípica foi realizada por citometria de fluxo para os seguintes marcadores: CD4, CD25, CD127, FoxP3, CD15s, CD45RA, CCR4, antígeno NEO-201, CEACAM5 e CEACAM6. A capacidade das Tregs isoladas de NEO-201 para suprimir a proliferação autóloga de células T CD4+ foi avaliada usando um ensaio de supressão da cocultura Treg. A porcentagem de células NEO-201+ na população de Tregs CD4+CD25highCD127-FoxP3+CD15s+CCR4+ variou de 61,8% a 81,9%. As Tregs NEO-201+ eram CD45RA-. Tregs CD4+NEO-201+ isoladas foram capazes de suprimir proliferação de células respondedoras CD4+ T.

[0017] Além disso, a capacidade do NEO-201 de mediar a morte de Tregs opsonizadas foi avaliada usando um ensaio CDC. O mAb NEO-201 demonstrou ser capaz de mediar a atividade CDC contra Tregs.

[0018] A partir desses resultados, conclui-se que o NEO-201 reage contra Tregs humanas e pode ser usado como um novo marcador para a identificação e purificação de Tregs. Tregs isoladas usando o mAb

NEO-201 eram funcionalmente supressores e podiam ser eliminados pela CDC. Com base na capacidade do anticorpo de se ligar às células Treg, também deve ocorrer a morte de células Treg mediada por ADCC. Esta aplicação demonstra pela primeira vez que esta droga anticâncer também pode ter utilidade no direcionamento da imunossupressão mediada por Treg da imunidade antitumoral.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS DIVERSAS VISTAS DOS DESENHOS**

[0019] **Figura 1: Isolamento de células Treg funcionais por NEO-201.** Porcentagem de Tregs funcionais isoladas usando kit comercial (CD4+CD127lowCD25+ humanas) ou seleção com base na expressão de NEO-201. O kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4+CD127lowCD25+ Humanas EasySep™ produziu 67,14% de células Treg ativas, enquanto a seleção baseada na expressão positiva de NEO-201 produziu 99,12% de células Treg ativas.

[0020] **Figura 2: As células T regulatórias são negativas para CEACAM-5 e CEACAM-6, conforme determinado por citometria de fluxo.** Análise fenotípica de T-regs isoladas (kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4+CD127lowCD25+ Humanas EasySep™ (HD 19). As células foram coradas com o anticorpo CD66 Anti-Humano de Camundongo PE (Clone B1.1/CD66) que reconhece CD66a (CEACAM1), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3) e CD66e (CEACAM5). 44,84% das células CD4 +/CD25high/CD127-/FOXP3 + são células NEO-201 +/CEACAM5- e CEACAM6-.

[0021] **Figura 3 O NEO-201 medeia a CDC contra CD4+ CD15s+ Tregs.** As células Treg expressam CD4 e CD15s (sialil Lewis X glicano). Só o complemento não matou Tregs. CDC mediada por NEO-201 contra células Treg. Reduziu a população de CD4+ CD15s+ Tregs em 53,4%. Procedimento: As células T CD4+ foram isoladas de PBMCs. As células foram tratadas +/- NEO-201 mAb (10 µg/mL). As células foram então tratadas +/- complemento (diluição 1:8, 2 h). As células foram lavadas e

coradas para marcadores CD4 e CD15s. A expressão do marcador foi medida por citometria de fluxo.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0022] Em um aspecto, a descrição fornece um método para matar células Treg *in vivo*, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201 a um paciente.

[0023] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para potencializar respostas imunes ao câncer em um paciente, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201 ao referido paciente.

[0024] O método pode ainda compreender administrar uma vacina contra o câncer ao referido paciente. Vacinas contra câncer exemplificativas que podem ser administradas são descritas em, por exemplo, Fisher et al., *Immun Inflamm Dis*. 2017 Mar; 5(1): 16–28; Klages et al., *Cancer Res* October 15 2010 (70) (20) 7788-7799; Reginato et al., *Br J Cancer*. 2013 Oct 15; 109(8): 2167–2174; Litzinger MT et al., *Blood* 2007, 110:3192, cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[0025] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para diminuir a infiltração de células Treg em um câncer em um paciente, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201 ao referido paciente.

[0026] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para estimular a regressão do câncer em um paciente, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201 ao referido paciente, ativando, intensificando ou estimulando a imunidade anticâncer no referido paciente.

[0027] O referido câncer não pode expressar CEACAM5 ou CEACAM6.

[0028] O referido método pode ainda compreender, antes ou no

momento da referida administração, determinar que o referido câncer é negativo para CEACAM5 e CEACAM6, que opcionalmente pode ser determinado por testes para a expressão da proteína CEACAM5 e CEACAM6, por exemplo, pela coloração com anticorpos específicos para CEACAM5 e/ou CEACAM6, como anticorpos reativos cruzados que se ligam especificamente a CEACAM5 e CEACAM6.

[0029] Em outro aspecto, a descrição fornece um método de tratamento ou prevenção de câncer, diminuição da carga de câncer ou diminuição da taxa de crescimento ou proliferação de câncer, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201 a um paciente em necessidade, em que o referido câncer é negativo para CEACAM5 e CEACAM6.

[0030] O referido método pode ainda compreender administrar outro agente terapêutico ao referido paciente. O referido outro agente pode ser selecionado de (a) inibidores de microtúbulos, inibidores de topoisomerase, platinas, agentes alquilantes e antimetabólitos; (b) MK-2206, ON 013105, RTA 402, BI 2536, Sorafenibe, ISIS-STAT3Rx, inibidor de microtúbulos, inibidor de topoisomerase, platina, agente alquilante, antimetabólito, paclitaxel, gemcitabina, doxorrubicina, vinblastina, etoposídeo, 5-fluorouracil, carboplatina, altretamina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, azacitidina, bleomicina, bussulfano, carmustina, clorambucil, 2-clorodeoxiadenosina, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, fosfato de estramustina, floxuridina, fludarabina, gentuzumabe, hexametilmelamina, hidroxiureia, ifosfamida, imatinibe, interferon, irinotecano, lomustina, mecloretamina, melfaleno, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, pentostatina, procarbazina, rituximabe, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, teniposídeo, 6-tioguanina, topotecano, trastuzumabe, vincristina, vindesina e/ou vinorelbina; (c) 1-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3 carboxamida, 9->2-hidróxi-etóxi

metilguanina, adamantanamina, 5-iodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferon, adenina arabinosídeo, inibidores de protease, inibidores de timidina quinase, inibidores de síntese de açúcar ou glicoproteína, inibidores estruturais de síntese proteica, inibidores de ligação e adsorção e análogos de nucleosídeos como aciclovir, penciclovir, valaciclovir e ganciclovir; (d) um inibidor de PD-1 ou anticorpo anti-PD-1, como KEYTRUDA<sup>®</sup> (pembrolizumabe) ou OPDIVO<sup>®</sup> (nivolumabe) ou (e) um inibidor de CTLA-4 ou anticorpo anti-CTLA-4, como YERVOY<sup>®</sup> ipilimumabe. Prevê-se que a combinação de inibição do ponto de verificação imune (inibição de PD-1 e/ou inibição de CTLA-4) com a ablação por Treg pode ser particularmente eficaz para terapia de câncer. Veja Vargas et al., *Immunity*. 2017 Apr 18; 46(4): 577–586 and Taylor et al., *J Clin Invest*. 2017; 127 (9):3472-3483, cada um dos quais é incorporado por referência na sua totalidade.

[0031] O referido anticorpo NEO-201 pode provocar ou aumentar uma resposta imune anticâncer no paciente.

[0032] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para matar células Treg *in vitro*, compreendendo contatar referidas células Treg com um anticorpo NEO-201. O referido método pode ainda compreender contatar as referidas células Treg com o complemento. As referidas células Treg podem ser mortas por CDC. O referido método pode ainda compreender contatar as referidas células Treg com células efetoras, tais como células assassinas naturais. As referidas células Treg podem ser mortas por ADCC.

[0033] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para matar células Treg *ex vivo*, compreendendo contatar uma amostra compreendendo células Treg com uma quantidade eficaz de um anticorpo NEO-201. A referida amostra pode ser obtida de um paciente.

[0034] O referido anticorpo NEO-201 pode ser acoplado a uma porção citotóxica.

[0035] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para detectar células Treg, compreendendo detectar a expressão do antígeno NEO-201 pelas referidas células Treg, opcionalmente em que o nível de células Treg em uma amostra de paciente, como uma amostra de sangue ou biópsia, é usado para diagnosticar câncer ou determinar o prognóstico do câncer. Opcionalmente, o referido método pode ainda compreender atribuir ou administrar tratamento a um paciente com base na detecção de células Treg. Por exemplo, o paciente pode ser designado para ser administrado ou pode ser administrado NEO-201 em uma quantidade eficaz para matar células Treg se células Treg forem detectadas na referida amostra de paciente.

[0036] O referido método pode compreender contatar as referidas células Treg com um anticorpo NEO-201.

[0037] A referida detecção pode compreender classificar as células, opcionalmente a classificação de células ativada por fluorescência.

[0038] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para detectar células Treg, compreendendo contatar células com um anticorpo NEO-201 e a detecção de células que expressam NEO-201. O referido anticorpo NEO-201 pode ser marcado direta ou indiretamente.

[0039] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para marcar células Treg, compreendendo contatar as células com um anticorpo NEO-201. O referido anticorpo NEO-201 pode ser marcado direta ou indiretamente.

[0040] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para isolar células Treg, compreendendo isolar células que expressam o antígeno NEO-201. O referido método pode compreender contatar uma amostra contendo células Treg com um anticorpo NEO-201, opcionalmente em que o referido anticorpo NEO-201 é marcado direta ou indiretamente. A referida amostra pode ser ou pode compreender

sangue ou medula óssea. O referido método pode compreender separar células Treg positivas para NEO-201 das células negativas para NEO-201. O referido método pode ainda compreender modificar geneticamente as referidas células Treg e, opcionalmente, introduzir as referidas células no referido paciente ou em outro indivíduo.

[0041] As referidas células Treg podem ser isoladas por triagem de células, opcionalmente triagem de células ativadas por fluorescência.

[0042] As referidas células Treg podem ser isoladas contatando com a amostra com um suporte compreendendo um anticorpo NEO-201, em que as referidas células Treg são retidas no referido suporte.

[0043] Os referidos métodos de coloração ou detecção podem compreender ainda a detecção da expressão de outro marcador ou combinação de marcadores cuja presença, ausência e/ou nível de expressão são indicativos de células Treg, por exemplo, CD4+, CD15s+, FoxP3+, CD25+, CCR4+ e/ou CD127<sup>low</sup> ou CD127-, como CD4+ CD15s+, CD4+ FoxP3+ CD25+, ou CD4+ FoxP3+ CD25+ CD127<sup>low</sup>, em combinação com NEO-201. Por exemplo, células que são NEO-201+ CD4+ CD15s+; NEO-201+ CD4+ CD15s+ FoxP3+ CD25+; NEO-201+ CD4+ CD15s+ FoxP3+ CD25+ CD127<sup>low</sup>; NEO-201+ CD4+ FoxP3+ CD25+; or NEO-201+ CD4+ FoxP3+ CD25+ CD127<sup>low</sup>; preferivelmente NEO-201+ CD4+ CD15s+; or preferably NEO-201+ CD4+ CD127<sup>low</sup> CD25+; ou preferivelmente CD4+ CD25<sup>high</sup> CD127- FoxP3+ CD15s+ CCR4+ podem ser identificadas, detectadas, isoladas e/ou purificadas como células Treg de acordo com os métodos aqui descritos.

[0044] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou preferencialmente todas as seis das sequências de CDR contidas nas SEQ ID N°: 28 e SEQ ID N°: 29.

[0045] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender uma sequência variável

da cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°: 38.

[0046] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender uma sequência da cadeia leve variável com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°: 39.

[0047] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender uma sequência variável da cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°: 38 e uma sequência variável da cadeia leve com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N°: 39

[0048] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender uma sequência da cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com os aminoácidos 20-470 da SEQ ID N°: 28 e uma sequência da cadeia leve com pelo menos 90% de identidade com aminoácidos 20-233 da SEQ ID N°: 29.

[0049] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender todas as seis das sequências de CDR contidas nas SEQ ID N°: 28 e SEQ ID N°: 29.

[0050] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender um domínio constante de IgG1 humana. Alternativamente, o referido anticorpo NEO-201 pode compreender um domínio constante de IgG2 humana, IgG3 humana ou IgG4 humana, ou um domínio híbrido ou quimérico compreendendo duas ou mais IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas.

[0051] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode ser humanizado.

[0052] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode ser conjugado com outra porção.

[0053] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o

referido anticorpo NEO-201 pode ser conjugado com outra porção citotóxica, marcador, porção radioativa ou etiqueta de afinidade.

[0054] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido anticorpo NEO-201 pode competir com o anticorpo contido na SEQ ID Nº: 28 e SEQ ID Nº: 29 pela ligação ao antígeno NEO-201.

[0055] Em qualquer um dos métodos anteriores ou seguintes, o referido câncer pode ser selecionado de neoplasias hematológicas, câncer de pulmão, como carcinoma pulmonar de células não pequenas, melanoma, doenças gastrointestinais, câncer de ovário, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de mama, câncer pancreático, mesotelioma, carcinoma de células renais metastático e câncer de próstata. O referido câncer pode compreender células Treg.

#### DEFINIÇÕES

[0056] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado daqueles comumente entendidos por um versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na invenção ou teste da presente invenção, os métodos e materiais adequados são descritos aqui. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

[0057] Conforme usado na descrição aqui e em todas as reivindicações a seguir, o significado de "um", "um" e "o" inclui referência plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0058] "Aminoácido", conforme usado neste documento, refere-se amplamente a aminoácidos sintéticos e naturais, bem como análogos e miméticos de aminoácidos que funcionam de maneira semelhante aos aminoácidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como os

aminoácidos que são modificados posteriormente, *por exemplo*, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato e O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos referem-se a compostos que possuem a mesma estrutura química básica que um aminoácido natural, isto é, um carbono a que está ligado a um hidrogênio, um grupo carboxil, um grupo amino e um grupo R, *por exemplo*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina e metil sulfônio. Tais análogos têm grupos R modificados (*por exemplo*, norleucina) ou estruturas peptídicas modificadas, mas retêm a mesma estrutura química básica que um aminoácido de ocorrência natural. Os miméticos de aminoácidos referem-se a compostos químicos que possuem uma estrutura diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funcionam de maneira semelhante a um aminoácido de ocorrência natural.

[0059] Os termos "esgotado por NK" ou "esgotado por assassina natural", conforme aqui utilizados, referem-se a um paciente com baixos níveis de células assassinas naturais (NK) em relação à faixa normal. As células NK são um linfócito imune citotóxico inato. Normalmente, as células NK compreendem 5-20% das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em um indivíduo saudável. Um paciente com células NK compreendendo menos que 5% das PMBCs é referido como esgotado por NK. Além disso, um paciente é referido como células NK severamente esgotadas se as células NK compreenderem menos que 3% das PMBCs. Além disso, em indivíduos normais, até 90% das células PBMC NK são células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK e são consideradas o subconjunto mais citotóxico. Se menos que 70% das células PBMC NK são células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK, o paciente é referido como esgotado por NK. Além disso, se menos de 50% das células PBMC NK são células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK, o paciente é referido como severamente esgotado por NK. Um determinado paciente pode ser referido como esgotado por NK ou severamente esgotado por NK, com base no atendimento de um

ou de ambos os critérios individuais. De um modo geral, o status de um paciente como esgotado por NK ou severamente esgotado por NK é determinado testando uma amostra retirada do paciente, por exemplo, uma amostra de sangue, por exemplo, uma amostra obtida e testada dentro de uma ou duas semanas antes. O status de um paciente como esgotado por NK ou severamente esgotado por NK também pode ser inferido a partir de um diagnóstico de doença e/ou um curso de tratamento associado a essa depleção de células NK.

[0060] "Anticorpo", como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer estrutura molecular contendo cadeia polipeptídica com uma forma específica que se encaixa e reconhece um epítipo, onde uma ou mais interações de ligação não covalentes estabilizam o complexo entre a estrutura molecular e o epítipo. A molécula de anticorpo arquetípica é a imunoglobulina e todos os tipos de imunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, de todas as fontes, *por exemplo*, humano, roedor, coelho, vaca, ovelha, porco, cachorro, frango, são considerados "anticorpos". Os anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos quiméricos, anticorpos humanos e outros anticorpos de mamíferos não humanos, anticorpos humanizados, anticorpos da cadeia única (scFvs), corpos de camelos, nanocorpos, IgNAR (anticorpos de cadeia única derivados de tubarões), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs), e fragmentos de anticorpos (*por exemplo*, Fabs, Fab', F(ab')<sub>2</sub>.) Inúmeras sequências de codificação de anticorpos foram descritas; e outros podem ser criados por métodos bem conhecidos na técnica. *Veja* Streltsov, *et al.* (2005) Protein Sci. 14(11): 2901–9; Greenberg, *et al.* (1995) Nature 374(6518): 168–173; Nuttall, *et al.* (2001) Mol Immunol. 38(4): 313–26; Hamers-Casterman, *et al.* (1993) Nature 363(6428): 446–8; Gill, *et al.* (2006) Curr Opin Biotechnol. 17(6): 653–8.

[0061] "Anticorpo NEO-201" refere-se a um anticorpo contendo as

cadeias pesada e leve das SEQ ID N<sup>o</sup>s: 28 e 29 ou as regiões variáveis opcionalmente em conjunto com as regiões constantes nele contidas, bem como fragmentos e variantes dos mesmos. Tais variantes incluem sequências contendo uma, duas, três, quatro, cinco ou preferencialmente todas as seis das sequências CDR contidas na SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e SEQ ID N<sup>o</sup>: 29, isto é, a cadeia pesada CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 32, a cadeia pesada CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 33, a cadeia pesada CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 34, a cadeia leve CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 35, a cadeia leve CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 36, e a cadeia leve CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 37. Tais variantes também incluem anticorpos que competem com o NEO-201 pela ligação ao antígeno NEO-201. O referido anticorpo pode ser humanizado. O referido anticorpo pode ser expresso contendo uma ou mais sequências líderes, que podem ser removidas durante a expressão e/ou processamento e secreção do anticorpo. O referido anticorpo pode ser apresentado em um formato monovalente, bivalente ou multivalente superior, incluindo, sem limitação, um anticorpo biespecífico ou multiespecífico contendo a referida sequência de anticorpo NEO-201 e um fragmento de ligação de um anticorpo diferente. Tipicamente, o referido anticorpo se liga especificamente a células de carcinoma e compete pela ligação a células de carcinoma com um anticorpo compreendendo a cadeia pesada variável da SEQ ID N<sup>o</sup>: 38 e a cadeia leve variável da SEQ ID N<sup>o</sup>: 39, ou compreendendo a cadeia pesada da SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e cadeia leve da SEQ ID N<sup>o</sup>: 29. Uma ou mais daquelas sequências de CDR contidas na SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e/ou SEQ ID N<sup>o</sup>: 29 podem ser substituídas por uma sequência variante, tal como a cadeia leve CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 ou 4; cadeia leve CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 ou 5; cadeia leve CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 3 ou 6; cadeia pesada CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 7; cadeia pesada CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 8,10, 30, ou 31; cadeia pesada CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 9 ou 11; ou SEQ ID N<sup>o</sup>s: 30-31. A cadeia leve pode compreender as CDRs contidas na sequência da

cadeia leve da SEQ ID N<sup>o</sup>: 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 29. A cadeia pesada pode compreender as CDRs contidas na sequência da cadeia pesada da SEQ ID N<sup>o</sup>: 15, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 29. O referido anticorpo pode compreender uma sequência variável da cadeia pesada possuindo pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a SEQ ID N<sup>o</sup>: 38 e/ou uma sequência variável da cadeia leve possuindo pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a SEQ ID N<sup>o</sup>: 39, opcionalmente em que a referida sequência da cadeia pesada e/ou leve contém uma, duas, três, quatro, cinco ou preferencialmente todas as seis das sequências CDR contidas na SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e SEQ ID N<sup>o</sup>: 29, isto é, a cadeia pesada CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 32, a cadeia pesada CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 33, a cadeia pesada CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 34, a cadeia leve CDR1 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 35, a cadeia leve CDR2 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 36, e a cadeia leve CDR3 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 37. O referido anticorpo pode ser conjugado com outra porção, tal como uma porção citotóxica, porção radioativa, marcador ou etiqueta de purificação.

[0062] "Antígeno", como aqui utilizado, refere-se amplamente a uma molécula ou uma porção de uma molécula capaz de ser ligada por um anticorpo que é adicionalmente capaz de induzir um animal a produzir um anticorpo capaz de se ligar a um epítipo desse antígeno. Um antígeno pode ter um epítipo ou ter mais de um epítipo. A reação específica aqui referida indica que o antígeno reagirá, de maneira altamente seletiva, com seu anticorpo correspondente e não com a multidão de outros anticorpos que podem ser evocados por outros antígenos. Os antígenos podem ser específicos do tumor (*por exemplo*, expressos por células neoplásicas do carcinoma pancreático e do cólon).

[0063] "Câncer", como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer doença neoplásica (invasiva ou metastática)

caracterizada por divisão celular anormal e descontrolada, causando crescimento maligno ou tumor.

[0064] "Vacina contra câncer", como usado neste documento, refere-se a uma composição imunogênica que provoca ou se destina a provocar uma resposta imune contra uma célula cancerígena.

[0065] "Anticorpo quimérico", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma molécula de anticorpo na qual a região constante, ou uma porção da mesma, é alterada, substituída ou trocada, de modo que o sítio de ligação ao antígeno (região variável) esteja ligado a uma região constante de uma classe diferente ou alterada, função efetor e/ou espécie, ou uma molécula completamente diferente que confere novas propriedades ao anticorpo quimérico, *por exemplo*, uma enzima, toxina, hormônio, fator de crescimento, droga; ou a região variável, ou uma porção da mesma, é alterada, substituída ou trocada por uma região variável com uma especificidade de antígeno diferente ou alterada.

[0066] "Variantes conservativamente modificadas", como usado neste documento, aplica-se a sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos e, com relação a sequências específicas de ácidos nucleicos, refere-se amplamente a variantes conservadoras modificadas refere-se aos ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácidos, para sequências essencialmente idênticas. Devido à degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica qualquer proteína. Tais variações de ácido nucleico são "variações silenciosas", que são uma espécie de variações modificadas conservadoramente. Cada sequência de ácido nucleico aqui que codifica um polipeptídeo também descreve todas as variações silenciosas possíveis do ácido nucleico. Alguém versado na técnica reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que

é normalmente o único códon para metionina, e TGG, que é normalmente o único códon para triptofano) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica.

[0067] "Região determinante de complementaridade", "região hipervariável" ou "CDR", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma ou mais das regiões hiper variáveis ou de determinação complementar (CDRs) encontradas nas regiões variáveis das cadeias leves ou pesadas de um anticorpo. *Veja Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MD. Essas expressões incluem as regiões hipervariáveis, conforme definido por Kabat, et al. (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA) ou os alças hipervariáveis em estruturas tridimensionais de anticorpos. Chothia and Lesk (1987) J Mol. Biol. 196: 901–917. As CDRs em cada cadeia são mantidas nas proximidades das regiões estruturais e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação ao antígeno. Dentro das CDRs, existem aminoácidos selecionados que foram descritos como regiões determinantes da seletividade (SDRs) que representam os resíduos críticos de contato usados pela CDR na interação anticorpo-antígeno. Kashmiri (2005) Methods 36: 25–34.*

[0068] "Quantidade de controle", como utilizado neste documento, refere-se amplamente a um marcador, pode ser qualquer quantidade ou uma faixa de quantidades a serem comparadas com uma quantidade de teste de um marcador. Por exemplo, uma quantidade de controle de um marcador pode ser a quantidade de um marcador em um paciente com uma doença ou condição específica ou em uma pessoa sem essa doença ou condição. Uma quantidade de controle pode estar em quantidade absoluta (*por exemplo*, micrograma/ml) ou em uma quantidade relativa (*por exemplo*, intensidade relativa de sinais).

[0069] "Diferentemente presente", como usado neste documento, refere-se amplamente a diferenças na quantidade ou qualidade de um marcador presente em uma amostra colhida de pacientes com uma doença ou condição em comparação com uma amostra comparável colhida de pacientes que não têm uma das doenças ou condições. Por exemplo, um fragmento de ácido nucleico pode opcionalmente estar presente diferencialmente entre as duas amostras se a quantidade do fragmento de ácido nucleico em uma amostra for significativamente diferente da quantidade do fragmento de ácido nucleico na outra amostra, por exemplo, medida por hibridação e/ou ensaios baseados em NAT. Um polipeptídeo está presente diferencialmente entre as duas amostras se a quantidade do polipeptídeo em uma amostra for significativamente diferente da quantidade do polipeptídeo na outra amostra. Deve-se notar que, se o marcador for detectável em uma amostra e não detectável na outra, esse marcador poderá ser considerado presente diferencialmente. Opcionalmente, uma quantidade relativamente baixa de infrarregulação pode servir como marcador.

[0070] "Diagnóstico", como usado neste documento, refere-se amplamente à identificação da presença ou natureza de uma condição patológica. Os métodos de diagnóstico diferem em sensibilidade e especificidade. A "sensibilidade" de um teste de diagnóstico é a porcentagem de indivíduos doentes que testam positivo (porcentagem de "verdadeiros positivos"). Indivíduos doentes não detectados pelo ensaio são "falsos negativos". Sujeitos que não estão doentes e que são negativos no teste são denominados "verdadeiros negativos". A "especificidade" de um teste de diagnóstico é de 1 menos a taxa de falsos positivos, onde a taxa de "falsos positivos" é definida como a proporção de pessoas sem a doença que apresentam resultados positivos. Embora um método de diagnóstico específico possa não

fornecer um diagnóstico definitivo de uma condição, basta que o método forneça uma indicação positiva que ajude no diagnóstico.

[0071] "Diagnóstico", como usado neste documento, refere-se amplamente à classificação de uma doença ou sintoma, determinação da gravidade da doença, monitoramento da progressão da doença, previsão do resultado de uma doença e/ou perspectivas de recuperação. O termo "detecção" também pode opcionalmente abranger qualquer um dos itens anteriores. O diagnóstico de uma doença de acordo com a presente invenção pode, em algumas modalidades, ser afetado pela determinação de um nível de um polinucleotídeo ou um polipeptídeo da presente invenção em uma amostra biológica obtida do sujeito, em que o nível determinado pode ser correlacionado com a predisposição para, ou presença ou ausência da doença. Deve-se notar que uma "amostra biológica obtida do sujeito" também pode opcionalmente compreender uma amostra que não foi fisicamente removida do sujeito.

[0072] "Quantidade eficaz", como usado neste documento, refere-se amplamente à quantidade de um composto, anticorpo, antígeno ou célula que atinge o resultado desejado. Uma "quantidade eficaz" quando administrada a um paciente para tratar uma doença, é suficiente para efetuar esse tratamento para a doença. A quantidade eficaz pode ser uma quantidade eficaz para profilaxia e/ou uma quantidade eficaz para prevenção. A quantidade eficaz pode ser uma quantidade eficaz para reduzir, uma quantidade eficaz para impedir a incidência de sinais/sintomas, reduzir a gravidade da incidência de sinais/sintomas, eliminar a incidência de sinais/sintomas, retardar o desenvolvimento da incidência de sinais/sintomas, impedir o desenvolvimento da incidência de sinais/sintomas e/ou da profilaxia do efeito da incidência de sinais/sintomas. A "quantidade eficaz" pode variar dependendo da doença e sua gravidade e idade, peso, histórico médico, suscetibilidade

e condições pré-existentes do paciente a ser tratado. O termo "quantidade eficaz" é sinônimo de "quantidade terapeuticamente eficaz" para os fins desta descrição.

[0073] "Vetor de expressão", como utilizado neste documento, refere-se amplamente a qualquer sistema de expressão recombinante com o objetivo de expressar uma sequência de ácido nucleico da presente descrição *in vitro* ou *in vivo*, constitutiva ou induzível, em qualquer célula, incluindo procariótica, levedura, fungo, célula de planta, inseto ou mamífero. O termo inclui sistemas de expressão linear ou circular. O termo inclui sistemas de expressão que permanecem episomais ou se integram ao genoma da célula hospedeira. Os sistemas de expressão podem ter a capacidade de se autorreplicar ou não, isto é, direcionar apenas a expressão transitória em uma célula. O termo inclui cassetes de expressão recombinante que contêm apenas os elementos mínimos necessários para a transcrição do ácido nucleico recombinante.

[0074] "Região estrutural" ou "FR", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma ou mais das regiões estruturais dentro das regiões variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo. *Veja Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, MD.* Estas expressões incluem aquelas regiões de sequência de aminoácidos interpostas entre as CDRs dentro das regiões variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo.

[0075] "Heterólogo", como usado neste documento, refere-se amplamente a porções de um ácido nucleico indica que o ácido nucleico compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido de forma recombinante, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostas para formar um novo

ácido nucleico funcional, *por exemplo*, um promotor de uma fonte e uma região de codificação de outra fonte. Da mesma forma, uma proteína heteróloga indica que a proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza (*por exemplo*, uma proteína de fusão).

[0076] "Alta afinidade", como usado neste documento, refere-se amplamente a um anticorpo com uma KD de pelo menos  $10^{-8}$  M, mais preferivelmente pelo menos  $10^{-9}$  M e ainda mais preferencialmente pelo menos  $10^{-10}$  M para um antígeno alvo. No entanto, a ligação de "alta afinidade" pode variar para outros isótipos de anticorpos. Por exemplo, a ligação de "alta afinidade" a um isótipo IgM refere-se a um anticorpo com uma KD de pelo menos  $10^{-7}$  M, mais preferivelmente pelo menos  $10^{-8}$  M.

[0077] "Homologia", como usado neste documento, refere-se amplamente a um grau de similaridade entre uma sequência de ácido nucleico e uma sequência de ácido nucleico de referência ou entre uma sequência de polipeptídeo e uma sequência de polipeptídeo de referência. A homologia pode ser parcial ou completa. A homologia completa indica que as sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos são idênticas. Uma sequência de ácido nucleico ou aminoácido parcialmente homóloga é aquela que não é idêntica à sequência de ácido nucleico ou aminoácido de referência. O grau de homologia pode ser determinado por comparação de sequência. O termo "identidade de sequência" pode ser usado de forma intercambiável com "homologia".

[0078] "Célula hospedeira", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma célula que contém um vetor de expressão e suporta a replicação ou expressão do vetor de expressão. As células hospedeiras podem ser células procarióticas, como E. coli, ou células eucarióticas, como leveduras, insetos (por exemplo, SF9), células de

anfíbios ou mamíferos, como CHO, HeLa, HEK-293, por exemplo, células cultivadas, explantes e células *in vivo*.

[0079] "Hibridação", como usado neste documento, refere-se amplamente à interação física das cadeias polinucleotídicas complementares (incluindo parcialmente complementares) pela formação de ligações de hidrogênio entre nucleotídeos complementares quando as cadeias estão dispostas antiparalelas umas às outras.

[0080] "K-assoc" ou "Ka", como usado neste documento, refere-se amplamente à taxa de associação de uma interação anticorpo-antígeno específica, enquanto o termo "Kdiss" ou "Kd", conforme usado neste documento, refere-se à taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. O termo "KD", como usado neste documento, destina-se a se referir à constante de dissociação, que é obtida a partir da razão de Kd para Ka (isto é,  $Kd/Ka$ ) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de KD para anticorpos podem ser determinados usando métodos bem estabelecidos na técnica.

[0081] "Imunoensaio", como utilizado neste documento, refere-se amplamente a um ensaio que usa um anticorpo para ligar especificamente um antígeno. O imunoensaio pode ser caracterizado pelo uso de propriedades de ligação específicas de um anticorpo específico para isolar, direcionar e/ou quantificar o antígeno.

[0082] "Isolado", como usado neste documento, refere-se amplamente ao material removido de seu ambiente original no qual ocorre naturalmente e, portanto, é alterado pela mão do homem em seu ambiente natural. O material isolado pode ser, por exemplo, ácido nucleico exógeno incluído em um sistema vetorial, ácido nucleico exógeno contido em uma célula hospedeira ou qualquer material que tenha sido removido de seu ambiente original e, portanto, alterado pela mão do homem (por exemplo, "anticorpo isolado").

[0083] "Marcador" ou uma "porção detectável", como utilizado neste

documento, refere-se amplamente a uma composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, químicos ou outros meios físicos.

[0084] "Baixa rigidez", "rigidez médio", "alta rigidez" ou "condições de rigidez muito alta", como usado neste documento, refere-se amplamente a condições para hibridação e lavagem de ácido nucleico. Orientações para a realização de reações de hibridação podem ser encontradas em Ausubel, et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology (5<sup>th</sup> Ed.) John Wiley & Sons, NY. Condições de hibridação específicas exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a: (1) condições de hibridação de baixa rigidez em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguida de duas lavagens em 0,2XSSC, SDS a 0,1% pelo menos a 50°C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55°C para condições de baixa rigidez); (2) condições de hibridação de rigidez médio em 6XSSC a aproximadamente 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em 0,2XSSC, 0,1% SDS a 60°C; (3) condições de hibridação de alta rigidez em 6XSSC a cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em 0,2XSSC, 0,1% SDS a 65°C; e (4) condições de hibridação de rigidez muito alta são fosfato de sódio 0,5M, SDS a 7% a 65°C, seguida por uma ou mais lavagens a 0,2XSSC, 1% SDS a 65°C.

[0085] O termo "nível baixo" ou "baixo", conforme usado em relação a um marcador como CD127, é bem conhecido na técnica e refere-se ao nível de expressão do marcador celular de interesse (por exemplo, CD 127), em que o nível de expressão do marcador de célula é baixo em comparação com o nível de expressão desse marcador de célula em outras células em uma população de células sendo analisadas como um todo. Mais particularmente, o termo "baixo" refere-se a uma população distinta de células que expressam o marcador celular em um nível inferior a uma ou mais populações distintas de células.

Consequentemente, CD127<sup>low</sup> se refere a células de um tipo que mancha levemente ou sem brilho quando contatado com um anticorpo CD127 marcado, por exemplo, em um nível que é mais alto que uma subpopulação de CD127-, mas mais baixo que a subpopulação de CD127+.

[0086] "Mamífero", como usado neste documento, refere-se amplamente a todos e quaisquer animais vertebrados de sangue quente da classe Mammalia, incluindo seres humanos, caracterizados por uma cobertura de pelos na pele e, na fêmea, glândulas mamárias produtoras de leite para nutrir a jovem. Exemplos de mamíferos incluem, entre outros, alpacas, tatus, capivaras, gatos, camelos, chimpanzés, chinchilas, gado, cães, cabras, gorilas, hamsters, cavalos, humanos, lêmures, lhamas, ratos, primatas não humanos, porcos, ratos, ovelhas, musaranhos, esquilos e antas. Os mamíferos incluem mas não estão limitados a espécies de bovinos, caninos, equinos, felinos, murinos, ovinos, suínos, primatas e roedores. Mamífero também inclui todos e quaisquer daqueles listados nas Espécies Mamíferas do Mundo, mantidas pelo Museu Nacional de História Natural, Smithsonian Institution, em Washington DC.

[0087] "Ácido nucleico" ou "sequência de ácido nucleico", como usado neste documento, refere-se amplamente a um oligonucleotídeo desoxi-ribonucleotídeo ou ribonucleotídeo, na forma de fita simples ou dupla. O termo abrange ácidos nucleicos, isto é, oligonucleotídeos, contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais. O termo também abrange estruturas semelhantes a ácidos nucleicos com espinhas dorsais sintéticas. Salvo indicação em contrário, uma sequência de ácido nucleico específica também inclui implicitamente variantes modificadas conservativamente (por exemplo, substituições de códons degeneradas) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada. O termo ácido nucleico é utilizado

alternadamente com gene, cDNA, mRNA, oligonucleotídeo e polinucleotídeo.

[0088] "Operativamente ligado", como usado neste documento, refere-se amplamente a quando dois fragmentos de DNA são unidos, de modo que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam dentro da estrutura.

[0089] "Parátomos", como usado neste documento, refere-se amplamente à parte de um anticorpo que reconhece um antígeno (por exemplo, o sítio de ligação ao antígeno de um anticorpo.) Os parátomos podem ser uma região pequena (por exemplo, 15 a 22 aminoácidos) da região Fv do anticorpo e podem conter partes das cadeias pesada e leve do anticorpo. Veja Goldsby, et al. Antigens (Chapter 3) Immunology (5<sup>th</sup> Ed.) New York: W.H. Freeman and Company, pages 57–75.

[0090] "Paciente", conforme usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer animal que precise de tratamento para aliviar um estado de doença ou para prevenir a ocorrência ou recorrência de um estado de doença. Além disso, "Paciente", conforme usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer animal que possua fatores de risco, histórico de doença, suscetibilidade, sintomas, sinais, tenha sido diagnosticado anteriormente, esteja em risco ou seja membro de uma população de pacientes com uma doença. O paciente pode ser um paciente clínico, como um humano ou um paciente veterinário, como um animal de companhia, domesticado, gado, exótico ou animal de zoológico. O termo "sujeito" pode ser usado de forma intercambiável com o termo "paciente". Em modalidades preferidas das invenções aqui descritas, o paciente é um humano.

[0091] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável e referem-se amplamente a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são análogos ou miméticos

de um aminoácido correspondente natural, bem como a polímeros de aminoácidos de ocorrência natural. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um mimético químico artificial de um aminoácido correspondente natural, bem como a polímeros de aminoácidos naturais e a um polímero de aminoácidos de ocorrência não natural. Os polipeptídeos podem ser modificados, por exemplo, pela adição de resíduos de carboidratos para formar glicoproteínas. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" incluem glicoproteínas, bem como não glicoproteínas.

[0092] "Promotor", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma matriz de sequências de ácidos nucleicos que direcionam a transcrição de um ácido nucleico. Como usado neste documento, um promotor inclui sequências necessárias de ácido nucleico próximas ao sítio inicial da transcrição, como, no caso de um promotor do tipo polimerase II, um elemento TATA. Um promotor também inclui opcionalmente elementos intensificadores ou repressores distais, que podem ser localizados, tanto quanto milhares de pares de base do sítio de partida da transcrição. Um promotor "constitutivo" é um promotor ativo sob a maioria das condições ambientais e de desenvolvimento. Um promotor "induzível" é um promotor ativo sob regulamentação ambiental ou de desenvolvimento.

[0093] "Quantidade profilaticamente eficaz", como usado neste documento, refere-se amplamente à quantidade de um composto que, quando administrado a um paciente para profilaxia de uma doença ou prevenção da recorrência de uma doença, é suficiente para efetuar tal profilaxia para a doença ou recorrência. A quantidade profilaticamente eficaz pode ser uma quantidade eficaz para evitar a incidência de sinais e/ou sintomas. A "quantidade profilaticamente eficaz" pode variar dependendo da doença e sua gravidade e idade, peso, histórico médico, predisposição a condições, condições pré-existentes, do paciente a ser tratado.

[0094] "Profilaxia", como usado neste documento, refere-se amplamente a um curso de terapia em que sinais e/ou sintomas não estão presentes no paciente, estão em remissão ou anteriormente estavam presentes em um paciente. A profilaxia inclui a prevenção da ocorrência de doenças subsequentes ao tratamento de uma doença em um paciente. Além disso, a prevenção inclui tratar pacientes que potencialmente desenvolvam a doença, especialmente pacientes suscetíveis à doença (por exemplo, membros de uma população de pacientes, pessoas com fatores de risco ou com risco de desenvolver a doença).

[0095] "Recombinante", como usado neste documento, refere-se amplamente com referência a um produto, por exemplo, a uma célula, ou ácido nucleico, proteína ou vetor, indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vetor foi modificada pela introdução de um ácido nucleico heterólogo ou proteína ou a alteração de um ácido nucleico ou proteína nativo ou a célula é derivada de uma célula assim modificada. Assim, por exemplo, as células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressar genes nativos que de outra forma são anormalmente expressos, subexpressos ou não expressos de forma alguma.

[0096] "Especificamente (ou seletivamente) se liga" a um anticorpo ou "especificamente (ou seletivamente) imunorreativo ao", ou "especificamente interage ou se liga", como usado neste documento, refere-se amplamente a uma proteína ou peptídeo (ou outro epítipo), refere-se a algumas modalidades, a uma reação de ligação que é determinante da presença da proteína em uma população heterogênea de proteínas e outros produtos biológicos. Por exemplo, sob condições de imunoenensaio designadas, os anticorpos especificados se ligam a uma proteína específica pelo menos duas vezes maior que o fundo (sinal não específico) e não se ligam substancialmente em quantidade

significativa a outras proteínas presentes na amostra. Tipicamente, uma reação específica ou seletiva será pelo menos duas vezes sinal ou ruído de fundo e mais tipicamente mais do que cerca de 10 a 100 vezes o fundo.

[0097] "Especificamente hibridizável" e "complementar", como usado neste documento, referem-se amplamente a um ácido nucleico que pode formar ligações de hidrogênio com outra sequência de ácido nucleico por Watson-Crick tradicional ou outros tipos não tradicionais. A energia livre de ligação para uma molécula de ácido nucleico com sua sequência complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico prossiga, por exemplo, atividade de RNAi. A determinação de energias livres de ligação para moléculas de ácido nucleico é bem conhecida na técnica. Veja, por exemplo, Turner, et al. (1987) CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123–33; Frier, et al. (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783–85. Uma complementaridade percentual indica a porcentagem de resíduos contíguos em uma molécula de ácido nucleico que pode formar ligações de hidrogênio (por exemplo, pareamento de bases Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácido nucleico (por exemplo, cerca de pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 em cada 10 são pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% complementares, inclusive). A complementaridade "perfeitamente complementar" ou 100% refere-se amplamente a todos os resíduos contíguos de uma sequência de hidrogênio da sequência de ácido nucleico com o mesmo número de resíduos contíguos em uma segunda sequência de ácido nucleico. "Complementaridade substancial" refere-se a cadeias polinucleotídicas que exibem cerca de pelo menos 90% de complementaridade, excluindo regiões das cadeias polinucleotídicas, como saliências, que são selecionadas para serem não complementares. A ligação específica requer um grau suficiente de complementaridade para evitar a ligação não específica do composto

oligomérico a sequências não alvo em condições nas quais a ligação específica é desejada, isto é, em condições fisiológicas no caso de ensaios *in vivo* ou tratamento terapêutico, ou em o caso de ensaios *in vitro*, nas condições em que os ensaios são realizados. As sequências não alvo tipicamente podem diferir em pelo menos 5 nucleotídeos.

[0098] "Sinais" da doença, como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer anormalidade indicativa da doença, detectável no exame do paciente; uma indicação objetiva da doença, em contraste com um sintoma, que é uma indicação subjetiva da doença.

[0099] "Suporte sólido", "suporte" e "substrato", como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer material que forneça uma estrutura sólida ou semissólida com a qual outro material possa ser conectado, incluindo, entre outros, suportes lisos (por exemplo, superfícies de metal, vidro, plástico, silicone e cerâmica), bem como materiais texturizados e porosos. Exemplos de suportes sólidos incluem esferas, tais como esferas ativadas, esferas responsivas magneticamente ou esferas marcadas com fluorescência.

[00100] "Sujeitos", como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer pessoa adequada para ser tratada de acordo com as invenções atualmente descritas incluem, mas não se limitam a sujeitos aviários e mamíferos, e são preferencialmente mamíferos. Os mamíferos no contexto das invenções presentemente descritas incluem, mas não estão limitados a, caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, suínos, roedores (por exemplo, ratos e camundongos), lagomorfos, primatas, seres humanos. Qualquer sujeito mamífero que precise ser tratado de acordo com as invenções presentemente descritas é adequado. Sujeitos humanos de qualquer gênero e em qualquer estágio do desenvolvimento (isto é, neonatos, lactentes, juvenis, adolescentes, adultos, idosos) podem ser tratados de acordo com a presente invenção. A presente invenção também pode ser

realizada em animais, particularmente mamíferos, como camundongos, ratos, cães, gatos, gado, cabras, ovelhas e cavalos para fins veterinários e para triagem e desenvolvimento de drogas. "Sujeitos" é usado de forma intercambiável com "pacientes". Em modalidades preferidas da invenção descrita, o sujeito é um humano.

[00101] "Sintomas" da doença, como usado neste documento, refere-se amplamente a qualquer fenômeno mórbido ou afastamento do normal em estrutura, função ou sensação, experimentado pelo paciente e indicativo de doença.

[00102] "Terapia", "terapêutico", "tratar" ou "tratamento", como usado neste documento, refere-se amplamente ao tratamento de uma doença, parada ou redução do desenvolvimento da doença ou de seus sintomas clínicos e/ou alívio da doença, causando regressão da doença ou seus sintomas clínicos. A terapia abrange profilaxia, tratamento, remédio, redução e/ou alívio de uma doença, sinais e/ou sintomas de uma doença. A terapia abrange um alívio de sinais e/ou sintomas em pacientes com sinais e/ou sintomas contínuos da doença (por exemplo, crescimento de tumores, metástases). A terapia também abrange "profilaxia". O termo "reduzido", para fins de terapia, refere-se amplamente à redução clínica significativa de sinais e/ou sintomas. A terapia inclui o tratamento de recidivas ou sinais e/ou sintomas recorrentes (por exemplo, crescimento de tumores, metástases). A terapia abrange, mas não se limita a, a qualquer momento, impedir o aparecimento de sinais e/ou sintomas, reduzir os sinais e/ou sintomas existentes e eliminar os sinais e/ou sintomas existentes. A terapia inclui o tratamento de doenças crônicas ("manutenção") e doenças agudas. Por exemplo, o tratamento inclui tratar ou prevenir recidivas ou a recorrência de sinais e/ou sintomas (por exemplo, crescimento de tumores, metástases).

[00103] "Região variável" ou "VR", como usado neste documento,

refere-se amplamente aos domínios dentro de cada par de cadeias leves e pesadas em um anticorpo que está envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável ( $V_H$ ) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável ( $V_L$ ) em uma extremidade e um domínio constante na outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada.

[00104] "Vetor", como usado neste documento, refere-se amplamente a um plasmídeo, cosmídeo, fagomídeo, DNA de fago ou outra molécula de DNA que é capaz de se replicar autonomamente em uma célula hospedeira e que é caracterizada por um ou um pequeno número de sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição nos quais essas sequências de DNA podem ser cortadas de maneira determinável sem perda de uma função biológica essencial do vetor, e nos quais o DNA pode ser inserido para provocar sua replicação e clonagem. O vetor pode ainda conter um marcador adequado para uso na identificação de células transformadas com o vetor.

[00105] As técnicas e procedimentos são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e tal como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo. Veja, por exemplo, Sambrook, et al. (2001) Molec. Cloning: Lab. Manual[3<sup>rd</sup> Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Técnicas padrão podem ser usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura de tecidos e transformação (por exemplo, eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e técnicas de purificação podem ser realizadas de acordo com as especificações do fabricante, ou como normalmente realizado na técnica ou como aqui descrito. As nomenclaturas utilizadas

em conexão com, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica aqui descritos são os bem conhecidos e vulgarmente utilizados na técnica. Podem ser utilizadas técnicas padrão para as sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e administração e tratamento de pacientes.

### **EXEMPLOS**

[00106] A invenção agora sendo geralmente descrita, será mais prontamente compreendida por referência aos seguintes exemplos, os quais estão incluídos meramente para fins de ilustração de certos aspectos e certas modalidades da presente invenção e não se destinam a limitar a invenção.

#### **EXEMPLO 1**

*NEO-201 pode isolar células Treg funcionais*

[00107] Neste exemplo, é mostrado que a classificação de células com base na ligação NEO-201 produz uma alta porcentagem de Tregs funcionais. A porcentagem de Tregs funcionais isoladas usando kit comercial (CD4+CD127lowCD25+ humanas) ou seleção com base na expressão de NEO-201 como mostrado na FIG.1. O kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4+CD127lowCD25+ Humanas EasySep™ produziu 67,14% de células Treg ativas, enquanto a seleção baseada na expressão positiva de NEO-201 produziu 99,12% de células Treg ativas.

[00108] Os requerentes mostraram anteriormente que o NEO-201 se liga a uma variante de glicoproteína associada ao câncer de CEACAM5 e CEACAM6. Sabe-se que as células Treg expressam CEACAM5 e CEACAM6. Para determinar ainda mais a base da ligação de NEO-201 às células Treg, as células foram testadas quanto à expressão de CEACAM5 e CEACAM6 por citometria de fluxo. As células T regulatórias são negativas para CEACAM-5 e CEACAM-6 (FIGURA 2).

[00109] *Métodos.* A ligação de marcadores Tregs humanas a Tregs humanas isoladas foi analisada por citometria de fluxo. As Tregs ( $1,0 \times 10^6$ ) foram incubadas com 1  $\mu$ L por teste de VIVO/MORTO Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS) por 30 min a 4°C para obter discriminação celular vivo versus morto. As células foram então centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS frio e depois coradas com anticorpo NEO-201 conjugado com Pacific Blue, anti-CD25-APC-H7, anti-CD15s-Alexa 488, anti-CD127-APC e coloração intracelular com anti-Foxp3-PerCP-CY5.5. (BioLegend, San Diego, CA) em 1X PBS + 1% de BSA (Teknova, Hollister, CA, EUA) por 30 minutos a 4°C. Após a coloração, as células foram lavadas duas vezes com PBS frio e examinadas usando um citômetro de fluxo inverso FACSV (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise da fluorescência celular foi realizada utilizando o software BD FACSuite (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). O isolamento de Tregs por um kit comercial foi realizado usando o kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4+CD127lowCD25+ Humanas EasySep™ (HD 19), de acordo com as instruções do fabricante. Para análise da expressão CEACAM, as células foram coradas com o anticorpo CD66 Anti-Humano de Camundongo PE (Clone B1.1/CD66) que reconhece CD66a (CEACAM1), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3) e CD66e (CEACAM5). 44,84% das células CD4 +/CD25high/CD127-/FOXp3 + são células NEO-201 +/CEACAM5- e CEACAM6-.

## **EXEMPLO 2**

[00110] *NEO-201 pode matar Tregs por citotoxicidade dependente de complemento (CDC)*

[00111] Este exemplo mostra que o NEO-201 pode mediar a CDC contra Tregs CD4+ CD15s+. As células Treg expressam CD4 e CD15s (sialil Lewis X glicano). As células T CD4+ foram isoladas de PBMCs e

as células foram tratadas +/- mAb NEO-201 (10 µg/mL). As células foram então tratadas +/- complemento (diluição 1:8, 2 h). As células foram então lavadas e coradas para marcadores CD4 e CD15s. A expressão do marcador foi medida por citometria de fluxo. Só o complemento não matou Tregs. No entanto, quando Tregs foram tratadas com NEO-201 e complemento, a população de Tregs CD4+ CD15s+ foi reduzida em 53,4%, indicando que a CDC ocorreu.

[00112] Métodos de ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Os ensaios de CDC foram realizados utilizando uma modificação de um procedimento descrito anteriormente (*Konishi et al.*, 2008). As células T CD4+ foram isoladas e depois tratadas com ou sem 10 µg/mL de NEO-201 por 15 min a 37°C para opsonizar as células. O complemento de coelho purificado (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) foi então adicionado às células na diluição de 1:8. Após incubação a 37°C por 120 min, as células foram lavadas e coradas com anticorpos marcados com fluorescência contra CD4 e CD15s. Após 30 min de incubação, as células foram lavadas e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo usando um BD FACSVerse. A análise da fluorescência celular foi realizada utilizando o software BD FACSuite (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

### **Exemplo 3**

#### **Geração do anticorpo monoclonal humanizado NEO-201**

[00113] A vacina específica para o câncer de cólon de Hollinshead foi usada como material imunogênico para gerar anticorpos monoclonais em camundongos. O método para a preparação de proteínas e peptídeos associados a tumores foi previamente descrito (Hollinshead, US4810781, 1989). Em resumo, o tecido cancerígeno foi picado e usado para gerar uma única suspensão celular que foi então submetida à extração por membrana salina hipotônica, uma série de etapas de centrifugação e seguida com sonicação de baixa frequência.

As proteínas extraídas por membrana resultantes foram fracionadas em resina Sephadex G-200 ou por métodos eletroforéticos, depois concentradas e quantificadas (Hollinshead *et al.*, 1970; Hollinshead *et al.*, 1972; Hollinshead *et al.*, 1985). A preparação de TAA foi misturada com adjuvante completo de Freund e injetada por via subcutânea em camundongos BALB/c. Isto foi seguido por 3 injeções de reforço no adjuvante incompleto de Freund, separadas por 2-3 semanas. O soro de camundongo foi testado por ELISA para respostas de anticorpos contra o antígeno imunizante e camundongos com respostas potentes foram usados para gerar células de hibridoma imortalizadas, fundindo as células B de camundongo do baço com a linhagem celular SP2/0-Ag14 e selecionando as células que cresceram e produziram imunoglobulinas de camundongo (IgGs). A partir destas IgGs de camundongo, o clone 16C3 murino (m16C3) foi escolhido com base na reatividade com o extrato de membrana de células tumorais do cólon derivado de células LS174T ou HT-29, conforme determinado por ELISA. Os cDNAs que codificam a IgG1 da cadeia pesada e leve foram determinados a partir de RNA isolado do clone de hibridoma 16C3 E12 e mostraram-se únicos (Bristol & Kantor, US7829678, 2010). A sequência da proteína m16C3 foi humanizada como h16C3 e designada NEO-201. A humanização foi realizada *in silico*, substituindo sequências de camundongos fora das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da região Fab de proteínas da cadeia pesada e leve por sequências Fab humanas, e retendo as três sequências de CDR de camundongos de cada cadeia. As regiões Fc das cadeias pesada e leve foram selecionadas a partir do isotipo IgG1 humano usado em outros produtos de mAb humanizados aprovados. A sequência de aminoácidos foi retrotraduzida em DNA, que foi otimizado para a expressão de proteínas em células CHO. O DNA da cadeia pesada e leve h16C3 foi então sintetizado quimicamente, clonado em

plasmídeos de expressão em mamíferos e transfectado em linhagens celulares de mamíferos (HEK293T e CHO). Várias linhagens celulares CHO estáveis que expressam h16C3 recombinante foram derivadas e depositadas. O h16C3 recombinante purificado foi testado novamente em estudos que verificaram que o anticorpo 16C3 humanizado tinha características semelhantes às do anticorpo m16C3 original (Bristol & Kantor, US7829678, 2010).

[00114] As sequências de anticorpos NEO-201 usadas nesses exemplos estão contidas na ilustração a seguir:

H16C3-Abb\* Cadeia pesada:

MGWSCIIFFLVATATGVHS/QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDIA  
MHWVRQAPGQRLEWMGLISTYSGDTKYNQNFQGRVTMTVDKSASTAYMELS  
 SLRSEDVAVYYCARGDYSGRYWFAYWGQGLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSK  
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID N°: 28)

H16C3-Abb\* Cadeia leve:

MGVPTQLLLLWLTVVVVRCDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASENIYGALN  
 WYQRKPKGKSPKLLIYGASNLATGMPSRFGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYC  
QQVLSPPYTFGGGTKLEIKR/TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE  
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSPVTKSFNRGEC SEQ ID N°:29)

[00115] Os limites entre a sequência líder da expressão, a região variável e a região constante são delimitados por uma barra ("/") em cada sequência, e as sequências CDR são mostradas em negrito, sublinhado. As sequências de anticorpos utilizadas incluíram as regiões variáveis e constantes mostradas. Estes incluem a cadeia pesada CDR1 da SEQ ID N°: 32, a cadeia pesada CDR2 da SEQ ID N°: 33, a cadeia pesada CDR3 da SEQ ID N°: 34, a cadeia leve CDR1 da SEQ ID N°: 35, a cadeia leve CDR2 da SEQ ID N°: 36, e a cadeia leve CDR3 da SEQ ID N°: 37.

## Abreviações

[00117] Esclerose lateral amiotrófica (ALS), citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), área sob curva de concentração de plasma-tempo do tempo 0 ao infinito (AUCinf), área normalizada da dose sob a curva de concentração de plasma-tempo do tempo 0 ao infinito (AUCinf/D), linha de base (BL), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), depuração (CL), concentração de plasma máxima observada (Cmax), concentração de plasma máxima medida normalizada da dose (Cmax/D), receptor de estrogênio (ER), meia-vida (HL), imunohistoquímica (IHC), esclerose múltipla (MS), assassina natural (NK), câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), células mononucleares do sangue periférico (PBMC), receptor de progesterona (PR), antígeno associado a tumor (TAA), tempo de concentração de plasma máxima observada (Tmax), volume de distribuição (Vz).

## Referências

[00118] Cada documento aqui citado, incluindo cada um na lista a seguir, é incorporado por referência em sua totalidade.

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1; 136(5):E359-86.
2. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non-conjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res*. 1996 Mar-Apr; 16(2):661-74.
3. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16-25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:329-60.

5. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov; 1(2):118-29.
6. Hodge JW, Greiner JW, Tsang KY, Sabzevari H, Kudo-Saito C, Grosenbach DW, Gulley JL, Arlen PM, Marshall JL, Panicali D, Schlom J. Costimulatory molecules as adjuvants for immunotherapy. *Front Biosci*. 2006 Jan 1;11: 788-803.
7. Vergati M IC, Huen NY, Schlom J, Tsang KY. Strategies for cancer vaccine development. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010(596432).
8. Gabitzsch ES TK, Palena C, David JM, Fantini M, Kwilas A, Rice AE, Latchman Y, Hodge JW, Gulley JL, Madan RA, Heery CR, Balint JP Jr, Jones FR, Schlom J. The generation and analyses of a novel combination of recombinant adenovirus vaccines targeting three tumor antigens as an immunotherapeutic. *Oncotarget*. 2015;6(31):31344-59.
9. Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*. 2011 Dec 20;29(36):4828-36.
10. Hollinshead A, Glew D, Bunnag B, Gold P, Herberman R. Skin-reactive soluble antigen from intestinal cancer-cell-membranes and relationship to carcinoembryonic antigens. *Lancet*. 1970; 1(7658):1191-1195.
11. Hollinshead AC, McWright CG, Alford TGD, Gold P, Herberman RB. Separation of skin reactive intestinal cancer antigen from the carcinoembryonic antigen of Gold. *Science*. 1972; 177(4052):887-889.
12. Hollinshead A, Elias EG, Arlen M, Buda B, Mosley M, Scherrer J. Specific active immunotherapy in patients with adenocarcinoma of the colon utilizing tumor-associated antigens (TAA). A phase I clinical trial. *Cancer*. 1985; 56(3):480-489.
13. Hollinshead AC. Methods of preparing epitopes of tumor associated antigens. *US4810781*. 1989.

14. Bristol JA, Kantor JA. Recombinant monoclonal antibodies and corresponding antigens for colon and pancreatic cancers. US7829678. 2010.
15. Hollinshead A. Active specific immunotherapy and immunochemotherapy in the treatment of lung and colon cancer. *Semin Surg Oncol*. 1991 Jul-Aug;7(4):199-210.
16. Luka J, Arlen PM, Bristol A. Development of a serum biomarker assay that differentiates tumor-associated MUC5AC (NPC-1C ANTIGEN) from normal MUC5AC. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:934757. doi: 10.1155/2011/934757. Epub 2010 Dec 16. PubMed PMID: 21197415
17. Patel SP, Bristol A, Saric O, Wang XP, Dubeykovskiy A, Arlen PM, Morse MA. Anti-tumor activity of a novel monoclonal antibody, NPC-1C, optimized for recognition of tumor antigen MUC5AC variant in preclinical models. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Jun;62(6):1011-9.
18. Beg MS, Azad NS, Patel SP, Torrealba J, Mavroukakis S, Beatson MA, Wang XP, Arlen PM, Morse MA. A phase 1 dose-escalation study of NEO-102 in patients with refractory colon and pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Sep;78(3):577-84.
19. Kim RD, Arlen PM, Tsang KY, Mavroukakis SA, Zaki A, Cui K, Azad NS, Tan Jr. BR, Poplin E, Morse MA, Beg MS. Ensituximab (E) in patients (pts) with refractory metastatic colorectal cancer (mCRC): Results of a phase 1/2 clinical trial. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 3081).
20. Zeligs K, Arlen PM, Tsang K, Hernandez L, Fantini M, Annunziata CM. Abstract 3025: Preclinical characterization of a novel monoclonal antibody targeting a neo-antigen expressed in ovarian and GI malignancies. *Cancer Res* July 1 2017 (77) (13 Supplement) 3025.

21. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol.* 2013 Mar 27; 4:76.
22. Petricevic B, Laengle J, Singer J, Sachet M, Fazekas J, Steger G, Bartsch R, Jensen-Jarolim E, Bergmann M. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med.* 2013 Dec 12; 11:307.
23. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 2004 Jul 1;64(13):4664-9.
24. Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, Barrio MM, von Euw EM, Morales SB, González M, Mordoh J, Bianchini M. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun.* 2009 Apr;15(2):91-100.
25. Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007 Feb 15;120 (4):781-7.
26. López-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent *in vitro* cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Nov;58 (11):1853-64. doi: 10.1007/s00262-009-0697-4.
27. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, Schlom J. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on

- Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015 Oct;3(10):1148-57.
28. Meyer S, Leusen JH, Boross P. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs.* 2014;6(5):1133-44.
  29. Strome SE, Sausville EA, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist.* 2007 Sep;12(9):1084-95.
  30. Hayes J, Frostell A, Karlsson R, Müller S, Millan-Martin S, Pauers M, Reuss F, Cosgrave E, Anneren C, Davey GP, Rudd PM. Identification of Fc gamma receptor glycoforms that produce differential binding kinetics for rituximab. *Mol Cell Proteomics.* 2017 Jun 2. pii: mcp.M117.066944. doi: 10.1074/mcp.M117.066944. [Epub ahead of print]
  31. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997 Aug 1;90(3):1109-14. PubMed PMID: 9242542.
  32. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1059-70. PubMed PMID: 9276722
  33. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Apr 10;26(11):1789-96.

34. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following *in vivo* therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 1990 Sep 1;50(17):5234-9.
35. Watanabe M, Kono K, Kawaguchi Y, Mizukami Y, Mimura K, Maruyama T, Fujii H. Interleukin-21 can efficiently restore impaired antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2010 Feb 2;102(3):520-9.
36. Han KP, Zhu X, Liu B, Jeng E, Kong L, Yovandich JL, Vyas VV, Marcus WD, Chavallaz PA, Romero CA, Rhode PR, Wong HC. IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine.* 2011 Dec;56(3):804-10.
37. Gomes-Giacoia E, Miyake M, Goodison S, Sriharan A, Zhang G, You L, Egan JO, Rhode PR, Parker AS, Chai KX, Wong HC, Rosser CJ. Intravesical ALT-803 and BCG treatment reduces tumor burden in a carcinogen induced bladder cancer rat model; a role for cytokine production and NK cell expansion. *PLoS One.* 2014 Jun 4;9(6):e96705.
38. Mathios D, Park CK, Marcus WD, Alter S, Rhode PR, Jeng EK, Wong HC, Pardoll DM, Lim M. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer.* 2016 Jan 1;138(1):187-94.
39. Rhode PR, Egan JO, Xu W, Hong H, Webb GM, Chen X, Liu B, Zhu X, Wen J, You L, Kong L, Edwards AC, Han K, Shi S, Alter S, Sacha JB, Jeng EK, Cai W, Wong HC. Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer Immunol Res.* 2016 Jan;4(1):49-60.

40. Kim PS, Kwilas AR, Xu W, Alter S, Jeng EK, Wong HC, Schlom J, Hodge JW. IL-15 superagonist/IL-15R $\alpha$ Sushi-Fc fusion complex (IL-15SA/IL-15R $\alpha$ Su-Fc; ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8<sup>+</sup> T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):16130-45.
41. Felices M, Chu S, Kodal B, Bendzick L, Ryan C, Lenvik AJ, Boylan KLM, Wong HC, Skubitz APN, Miller JS, Geller MA. IL-15 superagonist (ALT-803) enhances natural killer (NK) cell function against ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2017 Jun;145(3):453-461.
42. Rosario M, Liu B, Kong L, Collins LI, Schneider SE, Chen X, Han K, Jeng EK, Rhode PR, Leong JW, Schappe T, Jewell BA, Keppel CR, Shah K, Hess B, Romee R, Piwnica-Worms DR, Cashen AF, Bartlett NL, Wong HC, Fehniger TA. The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc $\gamma$ R11a-Triggered NK Cell Responses and *In vivo* Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016 Feb 1;22(3):596-608.
43. Seya T, Matsumoto M, Hara T, Hatanaka M, Masaoka T, Akedo H. Distribution of C3-step regulatory proteins of the complement system, CD35 (CR1), CD46 (MCP), and CD55 (DAF), in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 1994 Feb;12(5-6):395-400.
44. Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmaso AP. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):129-42.
45. Donin N, Jurianz K, Ziporen L, Schultz S, Kirschfink M, Fishelson Z. Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clin Exp Immunol*. 2003 Feb;131(2):254-63.

46. Hsu YF, Ajona D, Corrales L, Lopez-Picazo JM, Gurrpide A, Montuenga LM, Pio R. Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer*. 2010 Jun 7;9:139.
47. Konishi E, Kitai Y, Kondo T. Utilization of complement-dependent cytotoxicity to measure low levels of antibodies: application to nonstructural protein 1 in a model of Japanese encephalitis virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jan;15(1):88-94.
48. David JM, Dominguez C, McCampbell KK, Gulley JL, Schlom J, Palena C. A novel bifunctional anti-PD-L1/TGF- $\beta\beta$  Trap fusion protein (M7824) efficiently reverts mesenchymalization of human lung cancer cells. *Oncol Immunology*. 2017 Jul 13;6(10):e1349589.
49. Beyer M et al. *Blood* 2005,106,2018.
50. Motta M et al. *Leukemia* 2005,19:1788.
51. Yang ZZ et al. *Blood*, 2006, 107:3639.
52. Woo et al. *Cancer Res* 2001, 61:4766.
53. Javia et al. *J Immunother*. 2003, 26:85.
54. Sasada et al. *Cancer*, 2003:98:1089.
55. Curiel JT et al. *Nat Med* 2004, 10:942.
56. Schaefer et al. *Br.J.Cancer* 2005, 92:913.
57. Ormandy LA et al. *Cancer Res*, 2005:2457.
58. Liyanage UY et al. *J Immunol*, 2002,169:2756.
59. Delong P, et al. *Cancer Bio Ther* 2006, 4:342.
60. Dannull J et al. *J Clin Invest*, 2005, 115: 3623.
61. Vergati M et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2011, 60:197.
62. Miller AM, et al. *J Immunol* 2066, 177:7398.
63. Mukhetji B. *J Exp Med*. 1989, 169:1961.
64. Chakraborty NG et al. *J Immunol* 1990, 145:2359.
65. Barnett B et al. *Am J Reprod Immunol* 2005, 54:369.
66. Antony PA, et al. *J Immunother* 2002, 25:202.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Uso de um anticorpo NEO-201, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento ou composição para matar células Treg em um paciente.

2. Uso de um anticorpo NEO-201, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento ou composição para potencializar respostas imunes anticâncer em um paciente.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que uma vacina contra o câncer foi administrada ao referido paciente.

4. Uso de um anticorpo NEO-201, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento ou composição para diminuir a infiltração de células Treg em um câncer em um paciente.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que o referido câncer não expressa CEACAM5 ou CEACAM6.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda, antes ou no momento da referida administração, determinar que o referido câncer é negativo para CEACAM5 e CEACAM6.

7. Uso de um anticorpo NEO-201, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento ou composição para tratamento ou prevenção de câncer, diminuição da carga de câncer ou diminuição da taxa de crescimento ou proliferação de câncer, em que o referido câncer é negativo para CEACAM5 e CEACAM6.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que outro agente terapêutico é para ser administrado ao referido paciente.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o referido outro agente é selecionado dentre (a) inibidores

de microtúbulos, inibidores de topoisomerase, platinas, agentes alquilantes e antimetabólitos; (b) MK-2206, ON 013105, RTA 402, BI 2536, Sorafenibe, ISIS-STAT3Rx, inibidor de microtúbulos, inibidor de topoisomerase, platina, agente alquilante, antimetabólito, paclitaxel, gemcitabina, doxorubicina, vinblastina, etoposídeo, 5-fluorouracil, carboplatina, altretamina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, azacitidina, bleomicina, bussulfano, carmustina, clorambucil, 2-clorodeoxiadenosina, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, fosfato de estramustina, floxuridina, fludarabina, gentuzumabe, hexametilmelamina, hidroxíureia, ifosfamida, imatinibe, interferon, irinotecano, lomustina, mecloretamina, melfaleno, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, pentostatina, procarbazona, rituximabe, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, teniposídeo, 6-tioguanina, topotecano, trastuzumabe, vincristina, vindesina e/ou vinorelbina; (c) 1-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3 carboxamida, 9->2-hidróxi-etóxi metilguanina, adamantanamina, 5-iodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferon, adenina arabinosídeo, inibidores de protease, inibidores de timidina quinase, inibidores de síntese de açúcar ou glicoproteína, inibidores estruturais de síntese proteica, inibidores de ligação e adsorção e análogos de nucleosídeos como aciclovir, penciclovir, valaciclovir e ganciclovir; (d) um inibidor de PD-1 ou anticorpo anti-PD-1, como KEYTRUDA<sup>®</sup> (pembrolizumabe) ou OPDIVO<sup>®</sup> (nivolumabe) ou (e) um inibidor de CTLA-4 ou anticorpo anti-CTLA-4, como YERVOY<sup>®</sup> ipilimumabe.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 provoca ou aumenta uma resposta imune anticâncer no paciente.

11. Método para matar células Treg *in vitro*, caracterizado pelo fato de que compreende contatar as referidas células Treg com um anticorpo NEO-201.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda contatar as referidas células Treg com o complemento.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que as referidas células Treg são mortas por CDC.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda contatar as referidas células Treg com células efectoras.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que as referidas células efectoras compreendem células assassinas naturais.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que as referidas células Treg são mortas por ADCC.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 é acoplado a uma porção citotóxica.

18. Método para detectar células Treg, caracterizado pelo fato de que compreende detectar a expressão do antígeno NEO-201 pelas referidas células Treg, opcionalmente em que o nível de células Treg em uma amostra de paciente, como uma amostra de sangue ou biópsia, é usado para diagnosticar câncer ou determinar o prognóstico do câncer.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende contatar as referidas células Treg com um anticorpo NEO-201, em que opcionalmente o referido anticorpo NEO-201 está diretamente ou indiretamente acoplado a um marcador.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que a referida detecção compreende

selecionar células, opcionalmente selecionar células ativadas por fluorescência.

21. Método de coloração de células Treg, caracterizado pelo fato de que compreende contatar células com um anticorpo NEO-201.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 é diretamente ou indiretamente acoplado a um marcador.

23. Método para isolar células Treg, caracterizado pelo fato de que compreende isolar células que expressam o antígeno NEO-201.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma amostra contendo células Treg com um anticorpo NEO-201, opcionalmente em que o referido anticorpo NEO-201 é marcado direta ou indiretamente.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida amostra é ou compreende sangue ou medula óssea.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, caracterizado pelo fato de que compreende separar células Treg positivas para NEO-201 de células negativas para NEO-201.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que as referidas células Treg são isoladas por classificação celular, opcionalmente selecionar célula ativada por fluorescência.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que as referidas células Treg são isoladas por contato com a amostra com um suporte compreendendo um anticorpo NEO-201, pelo qual as referidas células Treg são retidas no referido suporte.

29. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 17, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

11 a 28, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou todas as seis das sequências de CDR contidas nas SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e SEQ ID N<sup>o</sup>: 29

30. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 29, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende uma sequência variável da cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N<sup>o</sup>: 38.

31. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17, 29 e 30, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 30, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende uma sequência variável da cadeia leve com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N<sup>o</sup>: 39.

32. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29 a 31, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 31, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende uma sequência variável da cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID N<sup>o</sup>: 38 e uma sequência variável da cadeia leve com pelo menos 90% de identidade com SEQ ID N<sup>o</sup>: 39.

33. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29 a 32, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 32, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende uma sequência de cadeia pesada com pelo menos 90% de identidade com os aminoácidos 20-470 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e uma sequência de cadeia leve com pelo menos 90% de identidade com aminoácidos 20-233 da SEQ ID N<sup>o</sup>: 29.

34. Uso ou método, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende todas as seis sequências de CDR contidas na SEQ ID N<sup>o</sup>: 28 e SEQ ID N<sup>o</sup>: 29.

35. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 10, 17 e 29 a 34, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 34, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 compreende um domínio constante de IgG1 humana.

36. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29 a 35, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 35, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 é humanizado.

37. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29 a 36, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 36, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 é conjugado com outra porção.

38. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, 17 e 29 a 37, ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 37, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo NEO-201 é conjugado com outra porção citotóxica, marcador, porção radioativa ou etiqueta de afinidade.

39. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é selecionado dentre malignidades hematológicas, câncer de pulmão, como carcinoma pulmonar de células não pequenas, melanoma, doenças malignas gastrointestinais, câncer de ovário, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de mama, câncer de pâncreas, mesotelioma, carcinoma de células renais metastático e câncer de próstata.

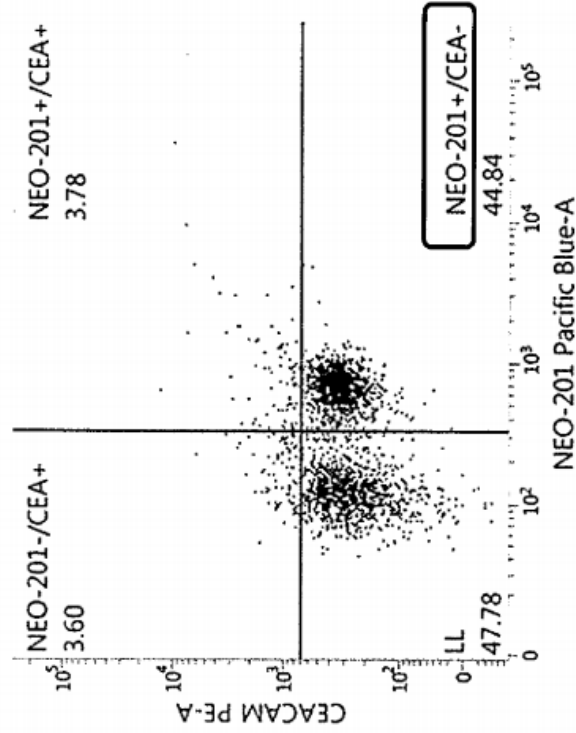
40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a modificação genética das referidas células Treg.

**FIG.1 Porcentagem de Tregs funcionais isoladas usando Kit<sup>1</sup> comercial ou com base na expressão<sup>2</sup> de NEO-201**

kit de Isolamento de Células T Regulatórias CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>+</sup> Humanas Easy Sep™	Kit de Seleção Positiva de NEO-201 de Biotina Humana de Liberação EasySep™
67.14*	99.12#

Os resultados são expressos em % mpedia de células NEO-201<sup>+</sup>/CD15s<sup>+</sup> em células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/FOXP3<sup>+</sup> (N=3\*)  
# de um doador

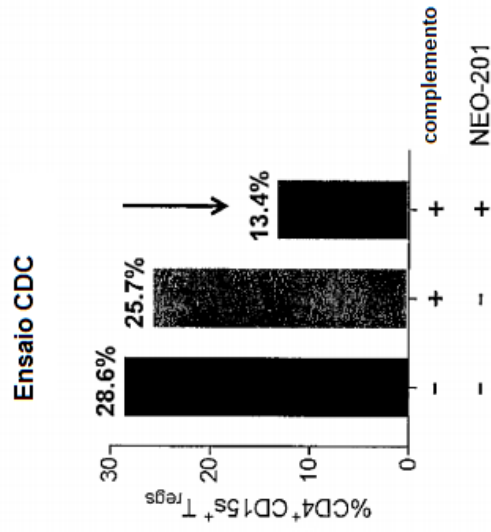
**FIG. 2. Células T regulatórias são negativas para CEACAM-5 e CEACAM-6 como determinado pela citometria de fluxo. Análise fenotípica de T-regs isoladas (kit de isolamento de Células T Regulatórias CD4+CD127lowCD25+ Humanas EasySep™ (HD 19).**



44,84% de células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>-</sup>/FOXp3<sup>+</sup> são células NEO21<sup>+</sup> /CEACAM5<sup>-</sup> e CEACAM6<sup>-</sup>.

As células foram coradas com anticorpo anti-CD66 humano de camundongo PE (Clone B1.1/CD66) que reconhece CD66a (CEACAM1), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3) e CD66e (CEACAM5)

**FIG. 3. NEO-201 medeia CDC contra Tregs CD4<sup>+</sup> CD15s<sup>+</sup>**



1. Células T CD4<sup>+</sup> isoladas de PBMCs.
2. Células tratadas +/- NEO201 mAb (10µg/mL).
3. Células tratadas +/- complemento (diluição 1:8, 2h).
4. Lavagem de células, coloração para marcadores CD4 e CD15s.
5. Medição de expressão por citometria de fluxo.

- Células Treg expressam CD4 e CD15s (sialyl Lewis X glycan).
- O complemento sozinho não matou Tregs
- CDC mediada por NEO-201 contra células Treg
  - Reduziu a população de Tregs CD4<sup>+</sup> CD15s<sup>+</sup> em 53.4%.

## RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIRECIONAR CÉLULAS TREG"**.

O anticorpo NEO-201 é mostrado para se ligar às células Treg, e seu uso no direcionamento de células Treg é descrito. O NEO-201 pode ser usado para isolamento, detecção ou purificação de células Treg ativas e também para matar células Treg. São descritos métodos terapêuticos e terapias de combinação usando NEO-201 opcionalmente em combinação com outro agente.

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 SEQUÊNCIA 12.08.20 P248368.TXT
- Data de Geração do Código: 12/08/2020
- Hora de Geração do Código: 10:34:21
- Código de Controle:
  - Campo 1: DF31EE56E7C54A1E
  - Campo 2: 4308A736BBE1FE5B