



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

(21) BR 112019022912-4 A2



(22) Data do Depósito: 04/05/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 26/05/2020

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR DOENÇAS OCULARES ALÉRGICAS

(51) Int. Cl.: A61K 39/395; A61P 27/14.

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2017 US 62/502,479.

(71) Depositante(es): ALLAKOS INC..

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER ROBERT BEBBINGTON; BRADFORD ANDREW YOUNGBLOOD; NENAD TOMASEVIC.

(86) Pedido PCT: PCT US2018031226 de 04/05/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/204868 de 08/11/2018

(85) Data da Fase Nacional: 31/10/2019

(57) Resumo: A presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Em particular, a presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença ocular alérgica através da administração de anticorpos que se ligam a Siglec-8 humana ou composições compreendendo os referidos anticorpos. A presente divulgação também fornece artigos de fabricação ou kits compreendendo anticorpos que se ligam a Siglec-8 humana para o tratamento de uma doença ocular alérgica.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR DOENÇAS OCULARES ALÉRGICAS**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório U.S. No. de Série 62/502.479, depositado em 5 de maio de 2017, cuja divulgação é incorporada aqui por referência na sua totalidade.

APRESENTAÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS NO ARQUIVO DE TEXTO ASCII

[0002] O conteúdo da seguinte apresentação no arquivo de texto ASCII é incorporado aqui por referência na sua totalidade: um formulário legível por computador (CRF) da Listagem de Sequências (nome do arquivo: 701712000740SEQLIST.TXT, data de registro: 3 de maio de 2018, tamanho: 115 KB).

CAMPO DE INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) pela administração de anticorpos que se ligam a Siglec-8 humano e composições compreendendo os referidos anticorpos.

ANTECEDENTES

[0004] As doenças oculares alérgicas representam algumas das doenças oculares mais comuns. O número de pessoas atingidas por doenças oculares alérgicas aumentou nas últimas décadas e agora acredita-se que afete pelo menos 15 a 20% da população (La Rosa, M. *et al.* (2013) *Ital. J. Pediatr.* 39: 18). Os sintomas variam em gravidade, desde irritação, vermelhidão e edema da conjuntiva até catarata e perda de visão.

[0005] As doenças oculares alérgicas abrangem um número de entidades clínicas específicas com diferentes mecanismos de ação.

Acredita-se que mecanismos IgE e não mediados por IgE estejam envolvidos, assim como múltiplas citocinas, quimiocinas e vias de sinalização (La Rosa, M. *et al.* (2013) *Ital. J. Pediatr.* 39:18). A hiperplasia dos mastócitos e a presença de eosinófilos foram observadas em algumas formas de doença ocular alérgica, como a ceratoconjuntivite atópica (Morgan, S.J. *et al.* (1991) *Eye* 5: 729-735), que pode levar ao desenvolvimento de cataratas e perda de visão.

[0006] Permanece a necessidade de novas abordagens terapêuticas que visem à inflamação subjacente a doenças oculares alérgicas.

[0007] Todas as referências aqui citadas, incluindo pedidos de patente, publicações de patentes e literatura científica, são aqui incorporadas por referência em sua totalidade, como se cada referência individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

SUMÁRIO BREVE

[0008] Para atender a essa e outras necessidades, a presente divulgação refere-se, inter alia, a métodos de tratamento ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) pela administração de anticorpos que se ligam ao Siglec humano -8 e/ou composições compreendendo os referidos anticorpos.

[0009] Por conseguinte, certos aspectos da presente divulgação se referem a métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença ocular alérgica em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano.

[0010] Outros aspectos da presente divulgação referem-se a métodos para tratamento ou prevenção de uma doença ocular alérgica em um indivíduo que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um anticorpo que

se liga ao Siglec-8 humano.

[0011] Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite alérgica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite alérgica sazonal. Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite alérgica perene. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ceratoconjuntivite atópica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ceratoconjuntivite vernal. Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite papilar gigante. Em algumas modalidades, o indivíduo usa lentes de contato. Em algumas modalidades, o indivíduo aumentou a inflamação em pelo menos uma porção da conjuntiva, em comparação a um indivíduo sem uma doença ocular alérgica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um número aumentado de mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e/ou linfócitos em pelo menos uma porção da conjuntiva, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica. Em algumas modalidades, uma raspagem conjuntival obtida do indivíduo compreende eosinófilos. Em algumas modalidades, uma amostra de soro ou lágrima obtida do indivíduo tem IgE aumentada, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica. Em algumas modalidades, um teste de alergia epicutâneo ou intracutâneo administrado ao indivíduo usando um alérgeno resulta em uma resposta alérgica. Em algumas modalidades, um ou mais sintomas no indivíduo são reduzidos em comparação com um nível basal antes da administração da composição ou anticorpo. Em algumas modalidades, um ou mais irritação conjuntival, vermelhidão conjuntival, edema conjuntival, secreção ocular, ulceração, lacrimejamento, hipertrofia da pálpebra, prurido, simbléfaro, eczema periocular, madarose, fotofobia, ceratite, papila gigante, e catarata no indivíduo são reduzidos em comparação com o nível basal antes da administração da composição ou anticorpo. Em algumas modalidades, a composição ou anticorpo é administrado por infusão intravenosa. Em algumas modalidades, a composição ou anti-

corpo é administrado por injeção subcutânea.

[0012] Em algumas modalidades dos métodos aqui descritos (por exemplo, *supra*), o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16 ou 21. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região Fc de cadeia pesada compreendendo uma região Fc de IgG humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG humana compreende uma IgG1 humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG humana compreende uma IgG4 humana. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 75; e/ou uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 76 ou 77. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de

aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs : 67-70; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 11-14; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 23-24. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-14; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-24. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-10; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-22. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende: (a) região variável de cadeia pesada compreendendo: (1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 26-29; (2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61; (3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 31-36; (4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62; (5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 38-43; (6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e (7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 45-46, e/ou (b) uma região variável

de cadeia leve compreendendo: (1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada dentre SEQ ID NOs: 48-49; (2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64; (3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 51-53; (4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65; (5) um LC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 55-58; (6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e (7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende: (a) região variável de cadeia pesada compreendendo: (1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 26; (2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61; (3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 34; (4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62; (5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 38; (6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e (7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NOs: 45; e/ou (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo: (1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 48; (2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64; (3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51; (4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65; (5) um LC-FR3 compreendendo o aminoácido s equivalência de SEQ ID NO: 55; (6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e (7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende: (a) região variável de cadeia pesada com-

preendendo: (1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 26; (2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61; (3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 34; (4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62; (5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 38; (6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e (7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NOs: 45; e/ou (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo: (1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 48; (2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64; (3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51; (4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65; (5) um LC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 58; (6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e (7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende: uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 91, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 94; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 100 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103; uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 92 e (iii) HVR-H3 compreen-

dendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 95; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 101 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 104; ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 93 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 96; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 102 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende: uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 106; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 109; uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 107; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 110; ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 108; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 111. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG1. Em algumas modalidades, o anticorpo foi modificado para melhorar a atividade de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC). Em algumas modalidades, o anticorpo compreende pelo menos uma substituição de aminoácidos na região Fc que melhora a atividade de ADCC. Em algumas modalidades, pelo menos

uma ou duas das cadeias pesadas do anticorpo não são fucosiladas. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende um fragmento de anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv e (Fab')₂.

[0013] Em algumas modalidades dos métodos aqui descritos (por exemplo, *supra*), o anticorpo compreende uma região Fc e cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo ligadas à região Fc, em que menos de 50% das cadeias de carboidrato ligado a N-glicosídeo do anticorpo na composição contêm um resíduo de fucose. Em algumas modalidades, substancialmente nenhuma das cadeias de carboidrato ligado a N-glicosídeo do anticorpo na composição contêm um resíduo de fucose. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um Siglec-8 humano e a um Siglec-8 de primata não humano. Em algumas modalidades, o primata não humano é um babuíno. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítipo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítipo no Domínio 3 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga ao mesmo epítipo que anticorpo 4F11. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítipo no Domínio 2 ou Domínio 3 do Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 113. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga ao mesmo epítipo que o anticorpo 1C3. Em algumas modalidades, o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga ao mesmo epítipo que o anticorpo 1H10. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítipo no Domínio 2

do Siglec-8 humano e compete com o anticorpo 4F11 pela ligação ao Siglec-8. Em algumas modalidades, o anticorpo não compete com o anticorpo 2E2 pela ligação ao Siglec-8. Em algumas modalidades, o anticorpo não é o anticorpo 2E2. Em algumas modalidades, o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região Fc de cadeia pesada compreendendo uma região Fc de IgG humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG humana compreende uma região Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG1 humana não é fucosilada. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG humana compreende uma região Fc de IgG4 humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG4 humana compreende a substituição de aminoácidos S228P, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice EU como em Kabat. Em algumas modalidades, o anticorpo esgota os eosinófilos no sangue e/ou inibe a ativação dos mastócitos.

[0014] Em algumas modalidades dos métodos aqui descritos (por exemplo, *supra*), a composição ou anticorpo é administrada em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais para tratamento ou prevenção de uma doença ocular alérgica. Em algumas modalidades, o (s) um ou mais agentes terapêuticos adicionais são selecionados a partir do grupo que consiste em um corticosteroide, anti-histamínico, cetotifeno, azelastina, epinastina, bepostatina, ciclosporina e um agente anti-inflamatório não esteroide (NSAID).

[0015] Em algumas modalidades dos métodos aqui descritos (por exemplo, *supra*), o indivíduo é um humano. Em algumas modalidades, o anticorpo está em uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0016] Outros aspectos da presente divulgação referem-se a um artigo de fabricação compreendendo um medicamento compreenden-

do uma composição compreendendo um anticorpo que se liga ao Si-glec-8 humano e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento em um indivíduo com necessidade de acordo com a qualquer uma das modalidades acima.

[0017] Deve ser entendido que uma, algumas, ou todas as propriedades das várias modalidades descritas neste documento podem ser combinadas para formar outras modalidades da presente divulgação. Estes e outros aspectos da presente divulgação se tornarão evidentes para um especialista na técnica. Estas e outras modalidades da presente divulgação são ainda descritas pela descrição detalhada a seguir.

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Definições

[0018] Deve ser entendido que a presente divulgação não se limita a composições particulares ou sistemas biológicos, que pode, é claro, variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada neste documento tem o objetivo de descrever apenas modalidades particulares, e não se destina a ser limitativa. Conforme usado nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes plurais, a menos que o conteúdo indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "uma molécula" inclui opcionalmente uma combinação de duas ou mais dessas moléculas, e similares.

[0019] O termo "cerca de", conforme usado aqui, refere-se à faixa de erro usual para o respectivo valor prontamente conhecido pelo especialista neste campo técnico. A referência a "cerca de" um valor ou parâmetro neste documento inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas a esse valor ou parâmetro per se.

[0020] Entende-se que aspectos e modalidades da presente divulgação incluem "compreendendo", "consistindo" e "consistindo essen-

cialmente em" aspectos e modalidades.

[0021] O termo "anticorpo" inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos de comprimento total que têm uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos e moléculas de cadeia simples), bem como fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, F(ab')₂ e Fv). O termo "imunoglobulina" (Ig) é usado de forma intercambiável com "anticorpo" neste documento.

[0022] A unidade básica de anticorpo de 4 cadeias é uma glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Um anticorpo IgM consiste em 5 das unidades básicas heterotetrâmeras, juntamente com um polipeptídeo adicional chamado cadeia J, e contém 10 sítios de ligação ao antígeno, enquanto os anticorpos IgA compreendem de 2 a 5 das unidades básicas de 4 cadeias que podem polimerizar para formar conjuntos polivalentes em combinação com a cadeia J. No caso de IgGs, a unidade de 4 cadeias é geralmente de cerca de 150.000 daltons. Cada cadeia L está ligada a uma cadeia H por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H estão ligadas uma à outra por uma ou mais ligações dissulfeto, dependendo do isótipo da cadeia H. Cada cadeia H e L também tem pontes dissulfeto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia H tem no N-terminal um domínio variável (V_H) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H para os isótipos μ e ε. Cada cadeia L tem no N-terminal, um domínio variável (V_L) seguido por um domínio constante na sua outra extremidade. O V_L está alinhado com o V_H e o C_L está alinhado com o primeiro domínio constante de cadeia pesada (C_{H1}). Pensa-se que resíduos particulares de aminoácidos formam uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia

pesada. O emparelhamento de um V_H e V_L juntos forma um único sítio de ligação ao antígeno. Para a estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, vide, por exemplo, *Basic e Clinical Immunology*, 8ª Edição, Daniel P. Sties, Abba I. Terr e Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 e capítulo 6.

[0023] A cadeia L de qualquer espécie de vertebrado pode ser atribuída a um dos dois tipos claramente distintos, chamados kappa e lambda, com base nas sequências de aminoácido de seus domínios constantes. Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas (CH), as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes ou isotipos. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, com cadeias pesadas designadas α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As classes γ e α são ainda divididas em subclasses com base em diferenças relativamente pequenas na sequência e na função CH, por exemplo, os seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os anticorpos IgG1 podem existir em múltiplas variantes polimórficas denominadas alótipes (revisados em Jefferis e Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Edição 4 1-7), qualquer um dos quais é adequado para uso na presente divulgação. Variantes alotípicas comuns em populações humanas são aquelas designadas pelas letras a, f, n, z.

[0024] Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado, separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente de produção (por exemplo, natural ou recombinante). Em algumas modalidades, o polipeptídeo isolado está livre de associação com todos os outros componentes do seu ambiente de produção. Os componentes contaminantes do seu ambiente de produção, como o resultante de células transfectadas recombinantes, são materiais que normalmente interferem nos usos de pesquisa, diagnóstico ou terapêutico do anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteicos

ou não proteicos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é purificado: (1) para mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado, por exemplo, pelo método de Lowry, e em algumas modalidades, para mais de 99% em peso; (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácido N-terminal ou interna pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de não redução ou redução usando azul de Coomassie ou coloração prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo in situ dentro das células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Normalmente, no entanto, um polipeptídeo ou anticorpo isolado é preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0025] O termo "anticorpo monoclonal", conforme usado aqui, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compõem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações que ocorrem naturalmente e/ou modificações pós-tradução (por exemplo, isomerizações, amidações) que podem estar presentes em quantidades menores. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais têm uma clivagem do C-terminal na cadeia pesada e/ou cadeia leve. Por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos são clivados no C-terminal de cadeia pesada e/ou cadeia leve. Em algumas modalidades, a clivagem do C-terminal remove uma lisina do C-terminal da cadeia pesada. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais têm uma clivagem no N-terminal na cadeia pesada e/ou cadeia leve. Por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos são clivados no N-terminal da cadeia pesada e/ou cadeia leve. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais são altamente específicos,

sendo direcionados contra vários sítios antigênicos (como um anticorpo biespecífico ou um anticorpo multiespecífico). O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente divulgação podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma, métodos de DNA recombinante, tecnologias de exibição de fagos e tecnologias para produzir anticorpos humanos ou similares a humanos em animais que têm partes ou todos dos loci ou genes de imunoglobulina humana codificando sequências de imunoglobulina humana.

[0026] O termo "anticorpo nu" refere-se a um anticorpo que não é conjugado com uma fração citotóxica ou radiomarcador.

[0027] Os termos "anticorpo completo", "anticorpo intacto" ou "anticorpo inteiro" são usados de forma intercambiável para se referir a um anticorpo em sua forma substancialmente intacta, em oposição a um fragmento de anticorpo. Os anticorpos especificamente inteiros incluem aqueles com cadeias pesadas e leves, incluindo uma região Fc. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humana) ou suas variantes de sequência de aminoácido. Em alguns casos, o anticorpo intacto pode ter uma ou mais funções efetoras.

[0028] Um "fragmento de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto, a ligação ao antígeno e/ou a região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (vide Patente U.S. No. 5.641.870, Exemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticorpo de cadeia simples e

anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

[0029] A digestão de anticorpos por papaína produziu dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, chamados fragmentos "Fab" e um fragmento residual "Fc", uma designação que reflete a capacidade de cristalizar rapidamente. O fragmento Fab consiste em uma cadeia L inteira, juntamente com o domínio da região variável de cadeia H (V_H) e o primeiro domínio constante de uma cadeia pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab é monovalente em relação à ligação ao antígeno, isto é, tem um único sítio de ligação ao antígeno. O tratamento com pepsina de um anticorpo produz um único fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dois fragmentos Fab ligados a dissulfeto com atividade de ligação a antígeno diferente e ainda é capaz de reticular o antígeno. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab por terem alguns resíduos adicionais no terminal carbóxi do domínio CH_1 incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' na qual o (s) resíduo (s) de cisteína dos domínios constantes têm um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas de charneira entre eles. Também são conhecidos outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos.

[0030] O fragmento Fc compreende as porções carbóxi-terminais de ambas as cadeias H mantidas juntas por dissulfetos. As funções efetoras dos anticorpos são determinadas por sequências na região Fc, região que também é reconhecida pelos receptores Fc (FcR) encontrados em certos tipos de células.

[0031] "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação ao antígeno e reconhecimento completo. Este fragmento consiste em um dímero de um domínio de região variável de

cadeia pesada e uma de cadeia leve em associação estreita e não covalente. Do desdobramento desses dois domínios emanam seis loops hipervariáveis (3 loops cada, das cadeias H e L) que contribuem com os resíduos de aminoácidos para a ligação ao antígeno e conferem especificidade à ligação ao antígeno no anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três HVRs específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora com uma afinidade menor do que todo o sítio de ligação.

[0032] "Fv de cadeia simples" também abreviado como "sFv" ou "scFv" são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios de anticorpo VH e VL conectados a uma única cadeia polipeptídica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo sFv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL, o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação ao antígeno. Para uma revisão do sFv, vide Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore, Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994).

[0033] "Fragmentos funcionais" dos anticorpos da presente divulgação compreendem uma porção de um anticorpo intacto, geralmente incluindo a região de ligação ao antígeno ou variável do anticorpo intacto ou a região Fv de um anticorpo que retém ou modificou a capacidade de ligação a FcR. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem anticorpo linear, moléculas de anticorpo de cadeia simples e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

[0034] Os anticorpos monoclonais aqui mencionados incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe de anticorpo específica ou

subclasse, enquanto o restante da (s) cadeia (s) é (são) idêntico (s) ou homólogo (s) às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos PRIMATIZED® em que a região de ligação ao antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por, por exemplo, imunizar macacos com um antígeno de interesse. Como usado aqui, "anticorpo humanizado" é usado como um subconjunto de "anticorpos quiméricos".

[0035] As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em uma modalidade, um anticorpo humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo receptor) na qual os resíduos de uma HVR do receptor são substituídos por resíduos de uma HVR de uma espécie não humana (anticorpo doador), como camundongo, rato, coelho ou primata não humano com a especificidade, afinidade e/ou capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos FR da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Essas modificações podem ser feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo, como afinidade de ligação. Em geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e, tipicamente, dois domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os loops hipervariáveis correspondem àqueles de uma sequência de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina

humana, embora as regiões FR possam incluir uma ou mais substituições individuais de resíduos FR que melhoram o desempenho do anticorpo, como afinidade de ligação, isomerização, imunogenicidade, etc. Em algumas modalidades, o número dessas substituições de aminoácidos no FR são não mais do que 6 na cadeia H, e na cadeia L, não mais que 3. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, vide, por exemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Vide também, por exemplo, Vaswani e Hamilton, *Ann. Alergia, Asthma e Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurlle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); e Pat. 6.982.321 e 7.087.409. Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados são direcionados contra um único sítio antigênico. Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados são direcionados contra múltiplos sítios antigênicos. Um método de humanização alternativo é descrito na Patente U.S. No. 7.981.843 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2006/0134098.

[0036] A "região variável" ou "domínio variável" de um anticorpo refere-se aos domínios amino-terminais da cadeia pesada ou leve do anticorpo. Os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve podem ser referidos como "VH" e "VL", respectivamente. Esses domínios são geralmente as partes mais variáveis do anticorpo (em relação a outros anticorpos da mesma classe) e contêm os locais de ligação ao antígeno.

[0037] O termo "região hipervariável", "HVR" ou "HV", quando usado aqui, refere-se às regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis em sequência e/ou formam loops estrutural-

mente definidos. Geralmente, os anticorpos compreendem seis HVRs; três no VH (H1, H2, H3) e três no VL (L1, L2, L3). Nos anticorpos nativos, H3 e L3 exibem a maior diversidade dos seis HVRs, e acredita-se que o H3, em particular, desempenhe um papel único ao conferir especificidade fina aos anticorpos. Vide, por exemplo, Xu *et al. Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson e Wu em *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De fato, os anticorpos camelídeos de ocorrência natural que consistem apenas em uma cadeia pesada são funcionais e estáveis na ausência de cadeia leve. Vide, por exemplo, Hamers-Casterman *et al., Nature* 363: 446-448 (1993) e Sheriff *et al., Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

[0038] Um número de delineamentos de HVR está em uso e é aqui abrangido. As HVRs que são regiões determinantes da complementaridade de Kabat (CDRs) são baseadas na variabilidade de sequência e são as mais comumente usadas (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). As HVRs de Chothia referem-se, em vez disso, à localização dos loops estruturais (Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As HVRs de "contato" são baseadas em uma análise das estruturas cristalinas complexas disponíveis. Os resíduos de cada uma dessas HVRs são anotados abaixo

Loop	Kabat	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeração Kabat)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeração Chothia)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0039] Salvo indicação em contrário, os resíduos de domínio vari-

ável (resíduos HVR e resíduos da região estrutural) são numerados de acordo com Kabat *et al.*, *supra*.

[0040] Os resíduos de "estrutura" ou "FR" são aqueles resíduos de domínio variável que não sejam os resíduos de HVR, conforme aqui definido.

[0041] A expressão "numeração de resíduos de domínio variável como em Kabat" ou "numeração de posição de aminoácidos como em Kabat" e suas variações refere-se ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat *et al.*, *supra*. Ao usar este sistema de numeração, a sequência linear de aminoácidos real pode conter menos ou mais aminoácidos correspondentes a um encurtamento ou inserção em uma FR ou HVR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir uma única inserção de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b e 82c, etc. de acordo com Kabat) após resíduo FR de cadeia pesada 82. A numeração Kabat de resíduos pode ser determinada para um determinado anticorpo por alinhamento nas regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada Kabat "padrão".

[0042] Uma "estrutura humana aceitadora" para os fins deste documento é uma estrutura que compreende a sequência de aminoácido de uma estrutura VL ou VH derivada de uma estrutura de imunoglobulina humana ou de uma estrutura de consenso humana. Uma estrutura humana aceitadora "derivada de" uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humana pode compreender a mesma sequência de aminoácido da mesma, ou pode conter alterações preexistentes na sequência de aminoácido. Em algumas modalidades, o número de alterações de aminoácidos preexistentes é 10 ou

menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, 6 ou menos, 5 ou menos, 4 ou menos, 3 ou menos ou 2 ou menos.

[0043] "Identidade de sequência de aminoácido porcentual (%)" em relação a uma sequência de polipeptídeo de referência é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de polipeptídeo de referência, depois de alinhar as sequências e introduzir espaços, se necessário, para obter a porcentagem máxima de identidade de sequência e não considerar nenhuma substituição conservadora como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácido pode ser alcançado de várias maneiras dentro da especialidade na técnica, por exemplo, usando software de computador disponível publicamente, como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os especialistas na técnica podem determinar parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências sendo comparadas. Por exemplo, a% de identidade da sequência de aminoácido de uma dada sequência de aminoácido A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácido B (que pode ser alternativamente formulada como uma determinada sequência de aminoácido A que tem ou compreende uma determinada% de aminoácidos a identidade de sequência para, com ou contra uma dada sequência de aminoácido B) é calculada da seguinte forma:

$$100 \text{ vezes a fração } X/Y$$

onde X é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como correspondências idênticas pela sequência no alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que, onde o comprimento da sequência de aminoácido

A não for igual ao comprimento da sequência de aminoácido B, a% de identidade de sequência de aminoácido de A para B não será igual à% de identidade de sequência de aminoácido de B para A.

[0044] Um anticorpo que "se liga a", "se liga especificamente a" ou é "específico a" um determinado polipeptídeo ou epítopo em um polipeptídeo específico é aquele que se liga a esse polipeptídeo ou epítopo em um polipeptídeo específico sem se ligar substancialmente a qualquer outro polipeptídeo ou epítopo polipeptídico. Em algumas modalidades, a ligação de um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) a um polipeptídeo não Siglec-8 não relacionado é inferior a cerca de 10% do anticorpo que se liga ao Siglec-8, conforme medido por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA)). Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga a um Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) tem uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 2\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,7\text{ nM}$, $\leq 0,6\text{ nM}$, $\leq 0,5\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ ou $\leq 0,001\text{ nM}$ (por exemplo, 10^{-8} M ou menos, por exemplo, 10^{-8} M a 10^{-13} M , por exemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

[0045] O termo "anticorpo anti-Siglec-8" ou "um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano" refere-se a um anticorpo que se liga a um polipeptídeo ou a um epítopo do Siglec-8 humano sem se ligar substancialmente a qualquer outro polipeptídeo ou epítopo de um polipeptídeo não Siglec-8 não relacionado.

[0046] O termo "Siglec-8", conforme aqui utilizado, refere-se a uma proteína Siglec-8 humano. O termo também inclui variantes naturais do Siglec-8, incluindo variantes de emenda ou variantes alélicas. A sequência de aminoácido de um Siglec-8 humano exemplar é mostrada em SEQ ID NO: 72. A sequência de aminoácido de outro Siglec-8 humano exemplar é mostrada em SEQ ID NO: 73. Em algumas modali-

dades, uma proteína de Siglec-8 humano compreende o domínio extracelular Siglec-8 humano fundido a uma região Fc de imunoglobulina. A sequência de aminoácido de um domínio extracelular de Siglec-8 humano exemplar fundido a uma região Fc de imunoglobulina é mostrada em SEQ ID NO: 74. A sequência de aminoácido sublinhada em SEQ ID NO: 74 indica a região Fc da sequência de aminoácido da proteína de fusão Siglec-8 Fc.

Sequência de Aminoácido de Siglec-8 humano

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAG
 DRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSDARK
 RDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGT
 LESGHSRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLT
 TPKPQDHGTSLTCCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQG
 DATAALGNGSSLVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCP
 SRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGT
 GTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVG
 DTGMEDAKAIRGSASQGPLETSWKDGNPLKKPPPAVAPSSGEEGEL
 HYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNP
 SSKEVRG (SEQ ID NO: 72)

Sequência de Aminoácido de Siglec-8 humano

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAG
 DRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSDARK
 RDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGT
 LESGHPRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLT
 TPKPQDHGTSLTCCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQG
 DATAALGNGSSLVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCP
 SRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGT
 GTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVG
 DTGMEDAKAIRGSASQGPLETSWKDGNPLKKPPPAVAPSSGEEGEL
 HYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNP

SSKEVRG (SEQ ID NO: 73)

Sequência de Aminoácido de Proteína de Fusão Fc de Siglec-8

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAG
 DRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARK
 RDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGT
 LESGHSRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLT
 LTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQG
 DATASTALGNGSSLVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCP
 SRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGT
 GTSRPVSQVTAAVGGIEGRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

[0047] Anticorpos que "induzem apoptose" ou são "apoptóticos" são aqueles que induzem a morte celular programada, conforme determinado por ensaios padrão de apoptose, como ligação da anexina V, fragmentação do DNA, encolhimento celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular, e/ou formação de vesículas de membrana (chamadas corpos apoptóticos). Por exemplo, a atividade apoptótica dos anticorpos anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) da presente divulgação pode ser mostrada através da coloração de células com anexina V.

[0048] As "funções efectoras" do anticorpo se referem às atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc variante da sequência de aminoácido) de um anticorpo e variam com o isótipo do anticorpo. Exemplos de funções efectoras de anticorpos incluem: ligação a C1q e citotoxicidade dependente de complemento; ligação ao receptor Fc; citotoxicidade mediada por célu-

la dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa de receptores de superfície celular (por exemplo, receptores de células B); e ativação de células B.

[0049] "Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" ou "ADCC" refere-se a uma forma de citotoxicidade na qual a Ig secretada se liga a receptores Fc (FcRs) presentes em certas células citotóxicas (por exemplo, células naturais assassinas (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que essas células efetoras citotóxicas se li-guem especificamente a uma célula alvo portadora de antígeno e sub-sequentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são necessários para matar a célula alvo por esse mecanismo. As células primárias para mediar células ADCC, NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto que os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de Fc nas células he-matopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Em algumas modalida-des, um anticorpo anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga a Siglec-8 humano) aqui descrito aprimora a ADCC. Para avaliar a ati-vidade ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio ADCC *in vitro*, como o descrito na Patente U.S. 5.500.362 ou 5.821.337 pode ser rea-lizado. As células efetoras úteis para esses ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células naturais assas-sinas (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal como o divulgado em Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95: 652-656 (1998). Outras variantes de Fc que alteram a atividade de ADCC e outras propriedades de anticorpos incluem aquelas divulga-das por Ghetie *et al.*, *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997; Duncan *et al.*, *Na-ture* 332:563-564, 1988; Lund *et al.*, *J. Immunol* 147:2657-2662, 1991; Lund *et al.*, *Mol Immunol* 29:53-59, 1992; Alegre *et al.*, *Transplantation*

57:1537-1543, 1994; Hutchins et al., Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984, 1995; Jefferis et al., Immunol Lett. 44:111-117, 1995; Lund et al., FASEB J9:115-119, 1995; Jefferis et al., Immunol Lett 54:101-104, 1996; Lund et al., J Immunol 157:4963-4969, 1996; Armour et al., Eur J Immunol 29:2613-2624, 1999; Idusogie et al., J Immunol 164:4178-4184, 2000; Reddy et al., J Immunol 164:1925-1933, 2000; Xu et al., Cell Immunol 200:16-26, 2000; Idusogie et al., J Immunol 166:2571-2575, 2001; Shields et al., J Biol Chem 276:6591-6604, 2001; Jefferis et al., Immunol Lett 82:57-65, 2002; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010, 2006; Pat. U.S. Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; 7,335,742; e 7,317,091.

[0050] O termo "região Fc" aqui é usado para definir uma região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é geralmente definida para se estender de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou de Pro230, ao seu terminal carboxila. As regiões Fc de sequência nativa adequadas para uso nos anticorpos da presente divulgação incluem IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. Uma única substituição de aminoácidos (S228P de acordo com a numeração de Kabat; designada IgG4Pro) pode ser introduzida para abolir a heterogeneidade observada no anticorpo IgG4 recombinante. Vide Angal, S. et al. (1993) Mol Immunol 30, 105-108.

[0051] O anticorpo "não fucosilado" ou "deficiente em fucose" refere-se a uma variante de anticorpo de glicosilação compreendendo uma região Fc em que uma estrutura de carboidrato ligada à região Fc re-

duz a fucose ou não tem fucose. Em algumas modalidades, um anticorpo com fucose reduzida ou sem fucose melhorou a função de ADCC. Os anticorpos não fucosilados ou deficientes em fucose reduziram a fucose em relação à quantidade de fucose no mesmo anticorpo produzido em uma linhagem celular. Em algumas modalidades, uma composição de anticorpo não fucosilada ou deficiente em fucose aqui contemplada é uma composição em que menos de cerca de 50% dos glicanos ligados a N ligados à região Fc dos anticorpos na composição compreendem fucose.

[0052] Os termos "fucosilação" ou "fucosilado" refere-se à presença de resíduos de fucose nos oligossacarídeos ligados ao esqueleto peptídico de um anticorpo. Especificamente, um anticorpo fucosilado compreende fucose ligada a $\alpha(1,6)$ no resíduo de N-acetilglucosamina (G1cNAc) mais interno em um ou ambos os oligossacarídeos ligados a N ligados à região Fc do anticorpo, por exemplo, na posição Asn 297 do domínio Fc de IgG1 humana (numeração EU de resíduos da região Fc). Asn297 também pode estar localizado a cerca de + 3 aminoácidos a montante ou a jusante da posição 297, isto é, entre as posições 294 e 300, devido a pequenas variações de sequência nas imunoglobulinas.

[0053] O "grau de fucosilação" é a porcentagem de oligossacarídeos fucosilados em relação a todos os oligossacarídeos identificados por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, em uma composição de anticorpo tratada com N-glicosidase F avaliada por espectrometria de massa de tempo-de-voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Em uma composição de um "anticorpo totalmente fucosilado" essencialmente todos os oligossacarídeos compreendem resíduos de fucose, isto é, são fucosilados. Em algumas modalidades, uma composição de um anticorpo totalmente fucosilado tem um grau de fucosilação de pelo menos cerca de 90%. Por

consequente, um anticorpo individual em tal composição tipicamente compreende resíduos de fucose em cada um dos dois oligossacarídeos ligados a N na região Fc. Por outro lado, em uma composição de um anticorpo "totalmente não fucosilado", essencialmente nenhum dos oligossacarídeos é fucosilado, e um anticorpo individual nessa composição não contém resíduos de fucose em nenhum dos dois oligossacarídeos ligados a N na região Fc. Em algumas modalidades, uma composição de um anticorpo totalmente não fucosilado tem um grau de fucosilação inferior a cerca de 10%. Em uma composição de um "anticorpo parcialmente fucosilado", apenas parte dos oligossacarídeos compreende fucose. Um anticorpo individual em tal composição pode compreender resíduos de fucose em nenhum, um ou ambos os oligossacarídeos ligados a N na região Fc, desde que a composição não compreenda essencialmente todos os anticorpos individuais que não tenham resíduos de fucose nos oligossacarídeos ligados a N em a região Fc, nem essencialmente todos os anticorpos individuais que contenham resíduos de fucose em ambos os oligossacarídeos ligados a N na região Fc. Em uma modalidade, uma composição de um anticorpo parcialmente fucosilado tem um grau de fucosilação de cerca de 10% a cerca de 80% (por exemplo, cerca de 50% a cerca de 80%, cerca de 60% a cerca de 80% ou cerca de 70% a cerca de 80%)

[0054] "Afinidade de ligação", conforme aqui utilizado, refere-se à força das interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno). Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um anticorpo a um Siglec-8 (que pode ser um dímero, como a proteína de fusão Siglec-8-Fc aqui descrita) pode geralmente ser representada por uma constante de dissociação (K_d). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo os aqui descritos.

[0055] "Avidez de ligação", conforme aqui utilizado, refere-se à força de ligação de múltiplos sítios de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno).

[0056] Uma molécula de ácido nucleico "isolada" que codifica os anticorpos aqui é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula contaminante de ácido nucleico com a qual está normalmente associada no ambiente em que foi produzida. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado está livre de associação com todos os componentes associados ao ambiente de produção. As moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos e anticorpos deste documento estão em uma forma diferente da forma ou configuração na qual são encontradas na natureza. As moléculas de ácido nucleico isoladas são portanto distinguidas do ácido nucleico que codifica os polipeptídeos e anticorpos aqui existentes naturalmente nas células.

[0057] O termo "formulação farmacêutica" refere-se a uma preparação que permite que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz e que não contém componentes adicionais que sejam inaceitavelmente tóxicos para um indivíduo ao qual a formulação seria ser administrada. Tais formulações são estéreis.

[0058] "Veículos", conforme aqui utilizado, incluem veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis que não são tóxicos para a célula ou mamífero que está sendo exposto a ele nas dosagens e concentrações empregadas. Frequentemente, o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa tamponada de pH. Exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipeptídeo de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina sérica, gelati-

na ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; álcoois de açúcar como manitol ou sorbitol; contraíons formadores de sal, como sódio; e/ou surfactantes não iônicos, como TWEEN™, polietileno glicol (PEG) e PLURONICS™.

[0059] Como aqui utilizado, o termo "tratamento" ou "tratar" refere-se à intervenção clínica projetada para alterar o curso natural do indivíduo ou célula sendo tratado durante o curso da patologia clínica. Os efeitos desejáveis do tratamento incluem diminuir a taxa de progressão da doença, melhorar ou amenizar o estado da doença e remissão ou prognóstico melhorado. Um indivíduo é "tratado" com sucesso, por exemplo, se um ou mais sintomas associados a uma doença (por exemplo, uma doença ocular alérgica) são suavizados ou eliminados. Por exemplo, um indivíduo é "tratado" com sucesso se o tratamento resultar no aumento da qualidade de vida daqueles que sofrem de uma doença, diminuindo a dose de outros medicamentos necessários para o tratamento da doença, reduzindo a frequência de recorrência da doença e diminuindo a gravidade da doença, retardando o desenvolvimento ou progressão da doença e/ou prolongando a sobrevivência dos indivíduos.

[0060] Conforme usado neste documento, "em conjunto com" ou "em combinação com" refere-se à administração de uma modalidade de tratamento além de outra modalidade de tratamento. Como tal, "em conjunto com" ou "em combinação com" refere-se à administração de uma modalidade de tratamento antes, durante ou após a administração da outra modalidade de tratamento ao indivíduo.

[0061] Como aqui utilizado, o termo "prevenção" ou "prevenir" inclui o fornecimento de profilaxia com relação à ocorrência ou recorrên-

cia de uma doença em um indivíduo. Um indivíduo pode estar predisposto a uma doença, ser suscetível a uma doença ou em estar em risco de desenvolver uma doença, mas ainda não foi diagnosticado com a doença. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) aqui descrito são usados para retardar o desenvolvimento de uma doença (por exemplo, uma doença ocular alérgica).

[0062] Como usado neste documento, um indivíduo "em risco" de desenvolver uma doença (por exemplo, uma doença ocular alérgica) pode ou não ter doença detectável ou sintomas de doença, e pode ou não ter exibido doença detectável ou sintomas de doença antes dos métodos de tratamento aqui descritos. "Em risco" denota que um indivíduo tem um ou mais fatores de risco, que são parâmetros mensuráveis que se correlacionam com o desenvolvimento da doença (por exemplo, uma doença ocular alérgica), como conhecido na técnica. Um indivíduo com um ou mais desses fatores de risco tem maior probabilidade de desenvolver a doença do que um indivíduo sem um ou mais desses fatores de risco.

[0063] Uma "quantidade eficaz" refere-se a pelo menos uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o efeito desejado ou indicado, incluindo um resultado terapêutico ou profilático. Uma quantidade eficaz pode ser fornecida em uma ou mais administrações. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é pelo menos a concentração mínima necessária para efetuar uma melhoria mensurável de uma doença específica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz neste documento pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo e peso do paciente e a capacidade do anticorpo de provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também pode ser aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo

são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática é usada em indivíduos antes ou no estágio inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz pode ser menor que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[0064] A administração "crônica" refere-se à administração do (s) medicamento (s) em um modo contínuo em oposição ao agudo, de modo a manter o efeito terapêutico inicial (atividade) por um período prolongado de tempo. A administração "intermitente" é um tratamento que não é realizado consecutivamente sem interrupção, mas é de natureza cíclica.

[0065] O termo "bula" é usado para se referir às instruções normalmente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, terapia combinada, contraindicações e/ou precauções sobre o uso de tais produtos terapêuticos.

[0066] Como usado aqui, um "indivíduo" ou um "indivíduo" é um mamífero. Um "mamífero" para fins de tratamento inclui seres humanos, animais domésticos e de fazenda e zoológico, animais de esporte ou estimação, como cães, cavalos, coelhos, gado, porcos, hamsters, roedores, camundongos, furões, ratos, gatos, etc. Em algumas modalidades, o indivíduo ou indivíduo é um humano.

II. Métodos

[0067] São aqui fornecidos métodos para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo aqui descrito que se liga ao Siglec-8 humano (por

exemplo, um anticorpo anti-Siglec-8) ou composições compreendendo os referidos anticorpos. Em algumas modalidades, o anticorpo está em uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

A. Doenças Oculares Alérgicas

[0068] Certos aspectos da presente divulgação referem-se a indivíduos com uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite alérgica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ceratoconjuntivite atópica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ceratoconjuntivite vernal. Em algumas modalidades, o indivíduo tem conjuntivite papilar gigante.

[0069] Em algumas modalidades, o indivíduo foi diagnosticado com conjuntivite alérgica. Em algumas modalidades, o indivíduo está em risco de desenvolver conjuntivite alérgica. A conjuntivite alérgica refere-se a várias doenças oculares alérgicas caracterizadas por uma reação alérgica de hipersensibilidade do tipo I (isto é, mediada por IgE) na conjuntiva. Ambas as formas sazonais e perenes são conhecidas, incluindo conjuntivite alérgica sazonal, conjuntivite alérgica perene (por exemplo, conjuntivite atópica ou ceratoconjuntivite atópica) e ceratoconjuntivite vernal.

[0070] Em algumas modalidades, o indivíduo foi diagnosticado com ceratoconjuntivite atópica ou vernal ou corre o risco de desenvolver ceratoconjuntivite atópica ou vernal. Ambas as formas de ceratoconjuntivite são caracterizadas por inflamação alérgica da superfície ocular, incluindo prurido, vermelhidão, edema e secreção. Objetos com ceratoconjuntivite vernal também costumam apresentar papilas gigantes na conjuntiva tarsal superior, enquanto papilas gigantes podem ou não estar presentes na ceratoconjuntivite atópica (La Rosa, M. *et al.*

(2013) *Ital. J. Pediatr.* 39:18). Embora a ceratoconjuntivite vernal seja observada apenas em climas quentes, a ceratoconjuntivite atópica pode ser observada com pouca ou nenhuma variação sazonal.

[0071] Em algumas modalidades, o indivíduo foi diagnosticado com conjuntivite papilar gigante ou corre o risco de desenvolver conjuntivite papilar gigante. A conjuntivite papilar gigante é caracterizada por hipertrofia papilar (por exemplo, da conjuntiva tarsal superior). Frequentemente, a irritação e a produção de IgE são causadas pelo uso de lentes de contato, e por exemplo, do acúmulo de proteínas e/ou irritação mecânica.

[0072] Os sintomas de doenças oculares alérgicas podem incluir, sem limitação, irritação conjuntival, vermelhidão conjuntival, edema conjuntival, secreção ocular, ulceração (por exemplo, ulceração da córnea), lacrimejamento, hipertrofia da pálpebra, prurido, simbléfaro, eczema periocular, madarose, fotofobia, ceratite, papila gigante, dor ocular, sensação de corpo estranho e catarata.

[0073] Os termos "referência" ou "valor de referência" usados de forma intercambiável neste documento podem se referir a uma medição ou caracterização de um valor ou sintoma em um indivíduo sem uma doença ocular alérgica (ou em um grupo de tais indivíduos). Um "valor de referência" pode ser um valor absoluto; um valor relativo; um valor que tenha um limite superior e/ou inferior; uma faixa de valores; um valor médio; um valor mediano; um valor médio; ou um valor em comparação com um valor de linha de base. Da mesma forma, um "valor de linha de base" pode ser um valor absoluto; um valor relativo; um valor que tenha um limite superior e/ou inferior; uma faixa de valores; um valor médio; um valor mediano; um valor médio; ou um valor em comparação com um valor de referência. Um valor de referência pode ser obtido de um indivíduo, de dois objetos diferentes ou de um grupo de indivíduos (por exemplo, um grupo de dois, três, quatro, cinco ou

mais indivíduos). Em algumas modalidades, um valor de referência refere-se a um valor padrão ou de referência no campo. Em algumas modalidades, um valor de referência refere-se a um valor calculado de novo a partir de um ou mais indivíduos (por exemplo, sem uma doença ocular alérgica).

[0074] Em algumas modalidades, uma raspagem conjuntival obtida a partir do indivíduo compreende eosinófilos. O exame de uma raspagem conjuntival para a presença de eosinófilos pode ser usado para diagnosticar uma doença ocular alérgica (por exemplo, ceratoconjuntivite vernal, como descrito em Bonini, S. *et al.* (2004) *Eye* 18:345-351); no entanto, a infiltração eosinofílica pode existir em tecidos conjuntivais mais profundos que não são acessíveis à raspagem superficial (vide Abelson, M.B. *et al.* (1983) *Arch. Ophthalmol.* 101: 555-556).

[0075] Em algumas modalidades, uma amostra de soro obtida do indivíduo aumentou a IgE, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica. Em algumas modalidades, uma amostra de lágrima obtida do indivíduo aumentou a IgE, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica. Técnicas para medir os níveis de IgE em uma amostra de lágrimas são conhecidas na técnica; vide, por exemplo, o teste de imunocromatografia Allerwatch® para IgE total de lágrimas (Hitachi Chemical Co.). As técnicas para medir os níveis de IgE em uma amostra de soro também são conhecidas na técnica (por exemplo, radioimunoensaio em camadas) e foram descritas faixas normais para a concentração média de IgE em uma amostra de soro obtida de pacientes de várias idades (vide Homburger HA: Allergic diseases. In *Clinical Diagnosis e Management by Laboratory Methods*. 21ª edição. Nova Iorque, WB Saunders Company, 2007, pp 961-971).

[0076] Em algumas modalidades, um teste de alergia epicutâneo ou intracutâneo administrado ao indivíduo usando um alérgeno resulta

em uma resposta alérgica. Os métodos para teste de alergia epicutâneo (por exemplo, picada na pele, arranhão, punção ou adesivo) e teste de alergia intracutâneo (por exemplo, intradérmico) são conhecidos na técnica. Normalmente, uma pequena quantidade de um ou mais alérgenos é introduzida em uma pequena área da pele (por exemplo, através de vias epicutâneas ou intracutâneas, como picada de agulha ou injeção), depois monitorada pelo médico para uma resposta alérgica (por exemplo, vermelhidão, edema, irritação, formação de pápulas, etc.). Em algumas modalidades, uma resposta alérgica é indicativa de uma reação mediada por IgE. Para doenças oculares alérgicas, o teste de alergia epicutâneo ou intracutâneo pode ser realizado para detectar hipersensibilidade a alérgenos no ar, incluindo, sem limitação, ácaros, pelos de animais e pólen.

B. Resposta ao Tratamento

[0077] Em algumas modalidades, a administração a um indivíduo como aqui descrito (por exemplo, um indivíduo com uma doença ocular alérgica) de uma quantidade eficaz de um anticorpo aqui descrito que se liga ao Siglec-8 humano (por exemplo, um anticorpo anti-Siglec-8) reduz um ou mais (por exemplo, um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, etc.) sintomas no indivíduo, em comparação com o nível basal antes da administração do anticorpo.

[0078] Os termos "linha de base" ou "valor de linha de base" usados de forma intercambiável neste documento podem se referir a uma medição ou caracterização de um sintoma antes da administração da terapia (por exemplo, um anticorpo anti-Siglec-8) ou no início da administração da terapia. O valor da linha de base pode ser comparado a um valor de referência para determinar a redução ou melhoria de um sintoma de uma doença ocular alérgica aqui contemplada. Um valor de referência e/ou valor de linha de base pode ser obtido de um indivíduo, de dois indivíduos diferentes ou de um grupo de indivíduos (por exem-

plo, um grupo de dois, três, quatro, cinco ou mais indivíduos).

[0079] Resposta ao tratamento em indivíduos com uma doença alérgica a doença geral pode ser avaliada por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a resposta ao tratamento em um indivíduo com uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) pode ser a redução ou melhoria de qualquer sintoma descrito aqui. Os sintomas da doença ocular alérgica podem incluir, mas não se limitam a, irritação conjuntival, vermelhidão conjuntival, edema conjuntival, secreção ocular, ulceração, lacrimejamento, hipertrofia das pálpebras, prurido, simbléfaro, eczema periocular, madarose, fotofobia, ceratite, papilas gigantes e catarata. A resposta ao tratamento pode resultar em remissão completa (CR), remissão parcial (PR) ou uma melhora clínica (CI) de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo.

[0080] Técnicas para medir a resposta ao tratamento de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) são conhecidas na área. Por exemplo, técnicas para medir a resposta ao tratamento podem incluir, sem limitação, uma diminuição em um ou mais sintomas clínicos (por exemplo, como descrito acima), raspagem conjuntival (por exemplo, para detecção de eosinófilos) e teste de IgE em amostras de soro e/ou lágrima. Em algumas modalidades, um Questionário de Sintoma de Conjuntivite Alérgica (ACS) é usado para avaliar sintomas associados a uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante).

C. Administração

[0081] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada de um agente ativo dependerá do tipo de doença a ser tratada, conforme definido acima, da gravidade e do curso da doença,

independentemente do agente ser administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do indivíduo e resposta ao agente, e a critério do médico assistente. O agente é adequadamente administrado ao indivíduo ao mesmo tempo ou durante uma série de tratamentos. Em algumas modalidades, um intervalo entre administrações de um anticorpo anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) descrito aqui é de cerca de um mês ou mais. Em algumas modalidades, o intervalo entre administrações é de cerca de dois meses, cerca de três meses, cerca de quatro meses, cerca de cinco meses, cerca de seis meses ou mais. Como aqui utilizado, um intervalo entre administrações refere-se ao período de tempo entre uma administração do anticorpo e a próxima administração do anticorpo. Como aqui utilizado, um intervalo de cerca de um mês inclui quatro semanas. Por conseguinte, em algumas modalidades, o intervalo entre administrações é de cerca de quatro semanas, cerca de cinco semanas, cerca de seis semanas, cerca de sete semanas, cerca de oito semanas, cerca de nove semanas, cerca de dez semanas, cerca de onze semanas, cerca de doze semanas, cerca de dezesseis semanas, cerca de vinte semanas, cerca de vinte e quatro semanas ou mais. Em algumas modalidades, o tratamento inclui múltiplas administrações do anticorpo, em que o intervalo entre administrações pode variar. Por exemplo, o intervalo entre a primeira administração e a segunda administração é de cerca de um mês e os intervalos entre as administrações subsequentes são de cerca de três meses. Em algumas modalidades, o intervalo entre a primeira administração e a segunda administração é de cerca de um mês, o intervalo entre a segunda administração e a terceira administração é de cerca de dois meses e os intervalos entre as administrações subsequentes são de cerca de três meses. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Si-

glic-8 humano) é administrado em uma dose plana. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,1 mg a cerca de 1800 mg por dose. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1700 mg e 1800 mg por dose. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 150 mg a cerca de 450 mg por dose. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg e 450 mg por dose. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 descrito aqui (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg por dose. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg por dose. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8

aqui descrito é administrado a um indivíduo em uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg ou 10,0 mg/kg. Qualquer uma das frequências de dosagem descritas acima pode ser usada. Qualquer frequência de dosagem descrita acima pode ser usada nos métodos ou usos das composições aqui descritas. A eficácia do tratamento com um anticorpo aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) pode ser avaliada usando qualquer uma das metodologias ou ensaios aqui descritos em intervalos que variam entre cada semana e a cada três meses. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento (por exemplo, redução ou melhoria de um ou mais sintomas) é avaliada aproximadamente a cada mês, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, a cada seis meses ou mais após a administração de um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento (por exemplo, redução ou melhoria de um ou mais sintomas) é avaliada aproximadamente a cada uma semana, a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada cinco semanas, a cada seis semanas, a cada sete semanas, a cada oito semanas, a cada nove semanas, a cada dez semanas, a cada onze semanas, a cada doze semanas, a cada dezesseis semanas, a cada vinte semanas, a cada vinte e quatro semanas ou mais.

[0082] Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo mensalmente em uma dosagem de até 3,0 mg/kg por infusão intravenosa. Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo mensalmente

em uma dosagem de até 3,0 mg/kg por injeção subcutânea. Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo a cada quatro semanas em uma dosagem de até 3,0 mg/kg por infusão intravenosa. Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é administrado a um indivíduo a cada quatro semanas em uma dosagem de até 3,0 mg/kg por injeção subcutânea.

[0083] Os anticorpos aqui descritos que se ligam ao Siglec-8 humano podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes nos métodos aqui descritos. Por exemplo, um anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano pode ser coadministrado com um ou mais (por exemplo, um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, etc.) agentes terapêuticos adicionais para tratamento e/ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Os agentes terapêuticos aqui contemplados incluem, mas não estão limitados a, um corticosteroide (por exemplo, budesonida, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona ou predisona), anti-histamínico (por exemplo, cloridrato de levocabastina ou olopatadina), cetotifeno, azelastina, epinastina, ciclinotestina, epinastina, e um agente anti-inflamatório não esteroide (NSAID).

[0084] Essas terapias combinadas mencionadas acima abrangem administração combinada (onde dois ou mais agentes terapêuticos estão incluídos na mesma ou em formulações separadas) e administração separada; nesse caso, a administração do anticorpo da presente divulgação pode ocorrer antes, simultaneamente e/ou a seguir administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, a administração de um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito e a administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais

ocorrem dentro de cerca de um mês, cerca de dois meses, cerca de três meses, cerca de quatro meses, cerca de cinco meses ou cerca de seis meses de entre si. Em algumas modalidades, a administração de um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito e a administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais ocorrem dentro de cerca de uma semana, cerca de duas semanas ou cerca de três semanas um do outro. Em algumas modalidades, a administração de um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito e a administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais ocorrem dentro de cerca de um dia, cerca de dois dias, cerca de três dias, cerca de quatro dias, cerca de cinco dias ou cerca de seis dias um do outro.

[0085] Os anticorpos anti-Siglec8 e/ou um ou mais agentes terapêuticos adicionais podem ser administrados por qualquer via de administração adequada conhecida na técnica, incluindo, sem limitação, por administração oral, administração sublingual, administração bucal, administração tópica, administração retal, por inalação, administração transdérmica, injeção subcutânea, injeção intradérmica, injeção intravenosa (IV), injeção intra-arterial, injeção intramuscular, injeção intracardíaca, injeção intraóssea, injeção intraperitoneal, administração transmucosa, administração vaginal, administração intravítrea, administração intra-articular, administração periarticular, administração local, administração epicutânea ou qualquer combinação das mesmas.

D. Anticorpos

[0086] Certos aspectos da presente divulgação fornecem anticorpos isolados que se ligam a um Siglec-8 humano (por exemplo, um anticorpo agonista que se liga ao Siglec-8 humano). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito tem uma ou mais das seguintes características: (1) liga-se a um Siglec-8 humano; (2) liga-se a um domínio extracelular de um Siglec-8 humano; (3) liga-se a um Siglec-8 humano com uma afinidade mais alta que o anticorpo 2E2

de camundongo e/ou anticorpo 2C4 de camundongo; (4) liga um Siglec-8 humano com uma avidéz mais alta que o anticorpo 2E2 de camundongo e/ou anticorpo 2C4 de camundongo; (5) tem uma T_m de cerca de 70°C-72°C ou superior em um ensaio de mudança térmica; (6) tem um grau reduzido de fucosilação ou é não fucosilado; (7) liga-se a um Siglec-8 humano expresso em eosinófilos e induz apoptose de eosinófilos; (8) liga-se a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e esgota ou reduz o número de mastócitos; (9) liga-se a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e inibe as atividades dos mastócitos dependentes de FcεRI (por exemplo, liberação de histamina, liberação de PGD₂, fluxo de Ca²⁺ e/ou liberação de β-hexosaminidase, etc.); (10) foi projetado para melhorar a atividade do ADCC; (11) liga-se a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e mata mastócitos pela atividade de ADCC (*in vitro* e/ou *in vivo*); (12) liga-se ao Siglec-8 de um primata humano e não humano; (13) liga-se ao Domínio 2, Domínio 2 e/ou Domínio 3 do Siglec-8 humano, ou liga-se a um polipeptídeo Siglec-8 compreendendo o Domínio 2, Domínio 2 e/ou Domínio 3 do Siglec-8 humano (por exemplo, fusão proteínas aqui descritas); e (14) esgota os eosinófilos ativados com um EC₅₀ menor que o EC₅₀ do anticorpo 2E2 ou 2C4 de camundongo. Qualquer um dos anticorpos descritos na Pat. 9.546.215 e/ou WO2015089117 podem ser utilizados nos métodos, composições e kits aqui fornecidos.

[0087] Em um aspecto, a presente divulgação fornece anticorpos que se ligam a um Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, o Siglec-8 humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 72. Em algumas modalidades, o Siglec-8 humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 73. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito se liga a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e esgota ou reduz o número de mastócitos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito se liga a um Siglec-8

humano expresso em mastócitos e inibe a atividade mediada por mastócitos.

[0088] Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos que se ligam a um Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, o Siglec-8 humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 72. Em algumas modalidades, o Siglec-8 humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 73. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítipo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítipo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 113. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítipo no Domínio 3 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 116, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 115. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 117, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 115. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 117, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 116. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítipo linear no domínio extracelular do Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítipo conformacional no domínio extracelular do Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito se liga a um Siglec-8 humano expresso em eosinófilos e induz a apoptose

de eosinófilos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito liga-se a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e esgota os mastócitos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito se liga a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e inibe a atividade mediada por mastócitos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito se liga a um Siglec-8 humano expresso em mastócitos e mata mastócitos pela atividade de ADCC. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito esgota os mastócitos e inibe a ativação dos mastócitos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui esgota os eosinófilos ativados e inibe a ativação dos mastócitos. Em algumas modalidades, um anticorpo aqui (por exemplo, um anticorpo anti-Siglec-8 não fucosilado) esgota os eosinófilos do sangue e inibe a ativação dos mastócitos.

[0089] É aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 isolado que se liga ao Siglec-8 humano e ao Siglec-8 de primata não humano. A identificação de anticorpos com reatividade cruzada de primatas seria útil para testes pré-clínicos de anticorpos anti-Siglec-8 em primatas não humanos. Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos que se ligam a um Siglec-8 de primata não humano. Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos que se ligam a um Siglec-8 humano e a um Siglec-8 de primata não humano. Em algumas modalidades, o Siglec-8 de primata não humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 118 ou uma porção dela. Em algumas modalidades, o Siglec-8 de primata não humano compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 119 ou uma porção dela. Em algumas modalidades, o primata não humano é um babuíno (por exemplo, *Papio Anubis*). Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano e um Siglec-8 de primata não humano, se liga a um epítopo no Domínio 2 do Siglec-8 humano. Em uma modalidade adicional, o Domínio 2 do Siglec-8 humano compreende a sequência de aminoáci-

do de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano e um Siglec-8 de primata não humano, se liga a um epítopo no Domínio 3 do Siglec-8 humano. Em uma modalidade adicional, o Domínio 3 do Siglec-8 humano compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano e a um Siglec-8 de primata não humano é um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humano. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano e um Siglec-8 de primata não humano é um anticorpo de murino. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga a um Siglec-8 humano e um Siglec-8 de primata não humano é um anticorpo IgG1 humano.

[0090] Em um aspecto, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito é um anticorpo monoclonal. Em um aspecto, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito é um fragmento de anticorpo (incluindo fragmento de ligação ao antígeno), por exemplo, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv ou (Fab')₂. Em um aspecto, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito compreende um fragmento de anticorpo (incluindo fragmento de ligação ao antígeno), por exemplo, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv ou (Fab')₂. Em um aspecto, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Em um aspecto, qualquer um dos anticorpos anti-Siglec-8 aqui descritos é purificado.

[0091] Em um aspecto, são fornecidos anticorpos anti-Siglec-8 que competem com o anticorpo de murino 2E2 e o anticorpo de murino 2C4 se ligando ao Siglec-8. Anticorpos anti-Siglec-8 que se ligam ao mesmo epítopo que o anticorpo de murino 2E2 e o anticorpo de murino 2C4 também são fornecidos. Anticorpos de murinos a Siglec-8, anticorpos 2E2 e 2C4 são descritos na Patente U.S. No. 8.207.305; Pat. 8.197.811, Pat. 7.871.612 e Pat. 7.557.191.

[0092] Em um aspecto, são fornecidos anticorpos anti-Siglec-8 que competem com qualquer anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2) para ligação ao Siglec-8. Anticorpos anti-Siglec-8 que se ligam ao mesmo epítipo que qualquer anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2) também são fornecidos.

[0093] Em um aspecto da presente divulgação, são fornecidos polinucleotídeos que codificam anticorpos anti-Siglec-8. Em certas modalidades, são fornecidos vetores compreendendo polinucleotídeos que codificam anticorpos anti-Siglec-8. Em certas modalidades, são fornecidas células hospedeiras que compreendem esses vetores. Em outro aspecto da presente divulgação, são fornecidas composições compreendendo anticorpos anti-Siglec-8 ou polinucleotídeos que codificam anticorpos anti-Siglec-8. Em certas modalidades, uma composição da presente divulgação é uma formulação farmacêutica para o tratamento de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Em certas modalidades, uma composição da presente divulgação é uma formulação farmacêutica para a prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante).

[0094] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 das sequências HVR do anticorpo de murino 2C4. Em um aspecto, fornecido aqui é um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 das sequências HVR do anticorpo de murino 2E2. Em algumas modalidades, a HVR é uma CDR Kabat ou uma CDR Chothia.

[0095] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 das sequências HVR do anticorpo de murino 1C3. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-

Siglec-8 compreendendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 das sequências HVR do anticorpo de murino 4F11. Num aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 das sequências HVR do anticorpo de murino 1H10. Em algumas modalidades, a HVR é uma CDR Kabat ou uma CDR Chothia.

[0096] Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 113. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 3 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114.

[0097] Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 116, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 115. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 117, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 115. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 117, mas não a uma proteína de fusão compreendendo o aminoácido de SEQ ID NO: 116.

[0098] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 91 e (iii) HVR-H3 compreendendo a se-

quência de aminoácido de SEQ ID NO: 94; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 100 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 113.

[0099] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 92 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 95; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 101 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 104. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 3 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga ao Siglec-8 humano e Siglec-8 de primata não humano.

[00100] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 93 e (iii) HVR-H3 compreendendo a se-

quência de aminoácido de SEQ ID NO: 96; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 102 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga a um epítopo no Domínio 2 do Siglec-8 humano, em que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112. Em algumas modalidades, o anticorpo aqui descrito se liga ao Siglec-8 humano e Siglec-8 de primata não humano.

[00101] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66.

[00102] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 67-70; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-

L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66.

[00103] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71.

[00104] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 67-70; e/ou em que a região variável de cadeia leve compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71.

[00105] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de amino-

ácido de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 91 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 94; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 100 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103.

[00106] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 92 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 95; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 101 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 104.

[00107] Em outro aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 93 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 96; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 102 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105.

[00108] Um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito pode compreender

qualquer sequência de domínio variável de estrutura adequada, desde que o anticorpo retenha a capacidade de se ligar ao Siglec-8 humano. Como aqui utilizado, as regiões estruturais da cadeia pesada são designadas "HC-FR1-FR4" e as regiões estruturais da cadeia leve são designadas "LC-FR1-FR4". Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 compreende uma sequência estrutural de domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26, 34, 38 e 45 (HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 e HC-FR4, respectivamente). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 compreende uma sequência estrutural de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 48, 51, 55 e 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 e LC-FR4, respectivamente). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 compreende uma sequência estrutural de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 48, 51, 58 e 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 e LC-FR4, respectivamente).

[00109] Em uma modalidade, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência estrutural e regiões hipervariáveis, em que a sequência da estrutura compreende as sequências HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NOs: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NOs: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NOs: 38-43 (HC-FR3) e SEQ ID NOs: 45 ou 46 (HC-FR4), respectivamente; o HVR-H1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61; o HVR-H2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62; e o HVR-H3 compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em uma modalidade, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência estrutural e regiões hipervariáveis, em que a sequência estrutural compreende as sequências HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NOs: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NOs: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NOs: 38-43 (HC-FR3) e SEQ ID NOs: 45 ou 46 (HC-FR4), respectivamente; o HVR-H1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61; o HVR-

H2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62; e o HVR-H3 compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 67-70. Em uma modalidade, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência estrutural e regiões hipervariáveis, em que a sequência estrutural compreende as sequências LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NOs: 48 ou 49 (LC-FR1), SEQ ID NOs: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NOs: 55-58 (LC-FR3) e SEQ ID NO: 60 (LC-FR4), respectivamente; o HVR-L1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64; o HVR-L2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65; e o HVR-L3 compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66. Em uma modalidade, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência estrutural e regiões hipervariáveis, em que a sequência estrutural compreende as sequências LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NOs: 48 ou 49 (LC-FR1), SEQ ID NOs: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NOs: 55-58 (LC-FR3) e SEQ ID NO: 60 (LC-FR4), respectivamente; o HVR-L1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64; o HVR-L2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65; e o HVR-L3 compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71. Numa modalidade desses anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-10 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-22. Em uma modalidade desses anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-10 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 23 ou 24. Em uma modalidade destes anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido seleciona-

da a partir de SEQ ID NOs: 11-14 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-22. Em uma modalidade desses anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 11-14 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 23 ou 24. Em uma modalidade destes anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16. Em uma modalidade desses anticorpos, o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 e o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21.

[00110] Em algumas modalidades, as sequências HVR de cadeia pesada compreendem o seguinte:

- a) HVR-H1 (IYGAH (SEQ ID NO: 61));
- b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO: 62)); e
- c) HVR-H3 (DGSSPYYYSMEY (SEQ ID NO: 63); DGSSPYYYGMEY (SEQ ID NO: 67); DGSSPYYYSMDY (SEQ ID NO: 68); DGSSPYYYSMEV (SEQ ID NO: 69); ou DGSSPYYYGMDV (SEQ ID NO: 70))).

[00111] Em algumas modalidades, as sequências HVR de cadeia pesada compreendem o seguinte:

- a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO: 88); DYMY (SEQ ID NO: 89); ou SSWMN (SEQ ID NO: 90));
- b) HVR-H2 (IISGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 91); RI-APEDGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO: 92); ou QIYPGDDYTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 93)); e c) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (SEQ ID NO: 94); EGNYYGSSILDY (SEQ ID NO: 95); ou LGPYGPFAD (SEQ ID NO:

96)).

[00112] Em algumas modalidades, as sequências FR de cadeia pesada compreendem o seguinte:

a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO: 26); EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO: 27); QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO: 28); SEQ ID NO: 28)

b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 31); WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO: 32); WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO: 33); WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO: 34); WVRQPPG ou WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO: 36));

c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 38); RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 39); RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 40); RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 41); RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 42) ou RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43)); e

d) HC-FR4 (WGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 45); ou WGQGTLLTVTVSS (SEQ ID NO: 46)).

[00113] Em algumas modalidades, as sequências HVR de cadeia leve compreendem o seguinte:

a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (SEQ ID NO: 64));

b) HVR-L2 (STSNLAS (SEQ ID NO: 65)); e

c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (SEQ ID NO: 66); ou QQRSSYPYT (SEQ ID NO: 71)).

[00114] Em algumas modalidades, as sequências HVR de cadeia leve compreendem o seguinte:

a) HVR-L1 (SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 97); RASQDIT-NYLN (SEQ ID NO: 98); ou SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 99));

b) HVR-L2 (DTSKLAY (SEQ ID NO: 100); FTSRLHS (SEQ ID NO: 101); ou DTSSLAS (SEQ ID NO: 102)); e

c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 103); QQGNTLPWT (SEQ ID NO: 104); ou QQWNSDPYT (SEQ ID NO: 105)).

[00115] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende:

uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 91 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 94; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 100 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103;

uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 92 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 95; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 101 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 104; ou

uma região variável de cadeia pesada compreendendo (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 93 e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 96; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoá-

cido de SEQ ID NO: 102 e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105.

[00116] Em algumas modalidades, as sequências FR de cadeia leve compreendem o seguinte:

a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 48); ou EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 49));

b) LC-FR2 (WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 51); WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO: 52); ou WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 53));

c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 55); GVPARFSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 56); GVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEGED: SEVID: 57); ou

GIPARFSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 58)); e

d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 60)).

[00117] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 (por exemplo, um anticorpo humanizado anti-Siglec-8) que se liga ao Siglec-8 humano, em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que o anticorpo compreende:

(a) domínio variável de cadeia pesada compreendendo:

(1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 26-29;

(2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61;

(3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 31-36;

(4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62;

(5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido

do selecionada a partir de SEQ ID NOs: 38-43;

(6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e

(7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 45-46, e/ou

(b) um domínio variável de cadeia leve que compreende:

(1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 48-49;

(2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64;

(3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 51-53;

(4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65;

(5) um LC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 55-58;

(6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e

(7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60.

[00118] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado a partir das SEQ ID NOs: 2-10 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado a partir de SEQ ID NOs: 16-22. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado de SEQ ID NOs: 2-14 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado de SEQ ID NOs: 16-24. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia

pesada selecionado a partir das SEQ ID NOs: 2-10 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado a partir de SEQ ID NO: 23 ou 24. Em um, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado a partir das SEQ ID NOs: 11-14 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado a partir de SEQ ID NOs: 16-22. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado a partir de SEQ ID NOs: 11-14 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado de SEQ ID NO: 23 ou 24. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 6 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado a partir de SEQ ID NO: 16 ou 21.

[00119] Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado a partir das SEQ ID NOs: 106-108 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado a partir de SEQ ID NOs: 109-111. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 106 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 109. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 107 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 110. Em um aspecto, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 108 e/ou compreendendo um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 111.

[00120] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-14. Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 106-108. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência contém substituições, inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas um anticorpo compreendendo essa sequência de aminoácido retém a capacidade de se ligar ao Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, as substituições, inserções ou deleções (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos) ocorrem em regiões fora das HVRs (isto é, nas FRs). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 106-108.

[00121] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-24. Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%

de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 109-111. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência contém substituições, inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas um anticorpo compreendendo essa sequência de aminoácido retém a capacidade de se ligar ao Siglec-8 humano. Em algumas modalidades, as substituições, inserções ou deleções (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos) ocorrem em regiões fora das HVRs (isto é, nas FRs). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16 ou 21. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 109-111.

[00122] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo (a) uma, duas ou três HVRs VH selecionadas a partir daquelas mostradas na Tabela 1 e/ou (b) uma, duas ou três HVRs VL selecionadas a partir as mostradas na Tabela 1.

[00123] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo (a) uma, duas ou três HVRs VH selecionadas a partir os mostrados na Tabela 2 e/ou (b) uma, duas ou três HVRs VL selecionadas a partir as mostradas na Tabela 2.

[00124] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo (a) um, dois, três ou quatro FR VH selecionados a partir dos mostrados na Tabela 3 e/ou (b) um, dois, três ou quatro FR de VL selecionados a partir os mostrados na Tabela 3.

[00125] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo um domínio variável de cadeia pesada

e/ou um domínio variável de cadeia leve de um anticorpo mostrado na Tabela 4, por exemplo, anticorpo HAKA, anticorpo HAKB, anticorpo HAKC, etc.

Tabela 1. Sequências de aminoácido de HVRs de anticorpos

Cadeia de anti-corpo	HVR1	HVR2	HVR3
<i>anticorpo 2E2</i>			
Cadeia pesada	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMEY SEQ ID NO:63
Cadeia leve	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Variantes de cadeia pesada humanizada 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2, e 2E2 RHB2</i>			
Cadeia pesada	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMEY SEQ ID NO:63
<i>Variantes de cadeia leve humanizada 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF, e 2E2 RKG</i>			
Cadeia leve	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Variantes de cadeia pesada humanizada 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, e 2E2 RHE triplo</i>			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMEY SEQ ID NO:67
2E2 RHE E-D	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMDY SEQ ID NO:68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMEV SEQ ID NO:69
2E2 RHE triplo	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMDV SEQ ID NO:70
<i>Variantes de cadeia leve humanizada 2E2 RKA F-Y e 2E2 RKF F-Y</i>			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71

Tabela 2. Sequências de aminoácido de HVRs dos anticorpos murinos 1C3, 1H10 e 4F11

Anticorpo	Cadeia	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Cadeia pesada	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGGSYTYSDSVKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFAY SEQ ID NO:94
1H10	Cadeia pesada	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAPKFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILDY SEQ ID NO:95
4F11	Cadeia pesada	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNYNGKFKG SEQ ID NO:93	LGPYGPFAD SEQ ID NO:96
1C3	Cadeia leve	SASSSVSYM SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
1H10	Cadeia leve	RASQDIT- NYLN SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
4F11	Cadeia leve	SASSSVSYMY SEQ ID NO:99	DTSSLAS SEQ ID NO:102	QQWNSDPYT SEQ ID NO:105

Tabela 3. Sequências de aminoácido de FRs de anticorpos

Cadeia pesada	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDD TALYYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:44)
2E2 RHA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31)	RFTI- SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNSKNTVYLMNSLRAED TAVYYCAR (SEQ ID NO:39)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31)	RFTI- SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO:33)	RFTI- SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34)	RFTI- SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAV	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)

			YYCAR (SEQ ID NO:38)	
2E2 RHF	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31)	RLTI- SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31)	RFSIS- KDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCAR (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:35)	RVTIS- VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CAR (SEQ ID NO:42)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:46)
2E2 RHB2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT (SEQ ID NO:29)	WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAAD TAVYYCAR (SEQ ID NO:43)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:46)
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34)	RFTI- SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34)	RFTI- SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)

			YYCAR (SEQ ID NO:38)	
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34)	RFTI- SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE triplo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34)	RFTI- SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
Cadeia leve	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMSASPGEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPKLWIY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGSGT- SYSLTISRMEAEDAATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKB	EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

			(SEQ ID NO:55)	
RKD	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKE	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTDFT- LTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

Tabela 4. Sequências de aminoácido de regiões variáveis de anticorpos

Nome do Anticorpo	Cadeia pesada variável	Cadeia leve variável
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)

Nome do Anticorpo	Cadeia pesada variável	Cadeia leve variável
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HEKF	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HFKA	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HFKB	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HFKC	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HFKD	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HFKE	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HFKF	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HFKG	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HGKA	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HGKB	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HGKC	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HGKD	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KFmut	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID

Nome do Anticorpo	Cadeia pesada variável	Cadeia leve variável
		NO:24)
HB2KFmut	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HEKAmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA F-Y mut (SEQ ID NO:23)
HEKFmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HAKFmut	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HBKFmut	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HCKFmut	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HDKFmut	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HFKFmut	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HGKFmut	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)

Nome do Anticorpo	Cadeia pesada variável	Cadeia leve variável
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Triplo-KA	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Triplo-KB	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Triplo-KC	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Triplo-KD	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Triplo-KE	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Triplo-KF	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Triplo-KG	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Triplo-KFmut	2E2 RHE triplo (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKFmut	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)

[00126] Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, com cadeias pesadas designadas α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As classes γ e α são ainda divididas em subclasses, por exemplo, os seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os anticorpos IgG1 podem existir em múltiplas variantes polimórficas denominadas alótipos (revisados em Jefferis e Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Edição 4 1-7), qualquer um dos quais é adequado para uso em algumas das modalidades aqui

descritas. Variantes alotípicas comuns em populações humanas são aquelas designadas pelas letras a, f, n, z ou combinações das mesmas. Em qualquer uma das modalidades deste documento, o anticorpo pode compreender uma região Fc de cadeia pesada compreendendo uma região Fc de IgG humana. Em outras modalidades, a região Fc de IgG humana compreende uma IgG1 ou IgG4 humana. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG1. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG4. Em algumas modalidades, a IgG4 humana compreende a substituição de aminoácidos S228P, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice EU como em Kabat. Em algumas modalidades, a IgG1 humana compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 78. Em algumas modalidades, a IgG4 humana compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 79.

[00127] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo anti-Siglec-8 compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 75; e/ou uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 76 ou 77. Em algumas modalidades, o anticorpo pode compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 87; e/ou uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 induz apoptose de eosinófilos ativados. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 induz apoptose de eosinófilos em repouso. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 esgota os eosinófilos ativados e inibe a ativação dos mastócitos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 esgota ou reduz os mastócitos e inibe a ativação dos mastócitos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 empobreceu ou reduz o número de mastócitos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 ma-

ta mastócitos pela atividade do ADCC. Em algumas modalidades, o anticorpo esgota ou reduz os mastócitos que expressam Siglec-8 em um tecido. Em algumas modalidades, o anticorpo esgota ou reduz os mastócitos que expressam Siglec-8 em um fluido biológico.

1. Afinidade de Anticorpo

[00128] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito se liga ao Siglec-8 humano com aproximadamente a mesma ou maior afinidade e/ou maior avidéz em comparação ao anticorpo 2E2 e/ou anticorpo 2C4. Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui fornecido tem uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 150\text{ nM}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 50\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ ou $\leq 0,001\text{ nM}$ (por exemplo, 10^{-8} M ou menos, por exemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por exemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito se liga ao Siglec-8 humano em cerca de 1,5 vezes, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 7 vezes, cerca de 8 vezes, cerca de 9 vezes ou 10 vezes mais afinidade do que o anticorpo de camundongo 2E2 e/ou m ouse o anticorpo 2C4. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16 ou 21.

[00129] Em uma modalidade, a afinidade de ligação do anticorpo anti-Siglec-8 pode ser determinada por um ensaio de ressonância plasmônica de superfície. Por exemplo, a K_d ou valor K_d podem ser medidos usando um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips de antígeno CM5 imobilizados em ~ 10 unidades de resposta (RU) Resumidamente, os chips de biossensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc.) são ativa-

dos com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. Os anticorpos de captura (por exemplo, anti-Fc humano) são diluídos com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, antes da injeção a uma taxa de fluxo de 30 µl/minuto e imobilizados com um anticorpo anti-Siglec-8. Para medições de cinética, injeções diluídas em série de Siglec-8 dimérico são injetadas em PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a uma taxa de fluxo de aproximadamente 25 µl/min. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas usando um modelo de ligação Langmuir um para um simples (Software BIAcore® Evaluation versão 3.2), ajustando simultaneamente os sensores de associação e dissociação. A constante de dissociação de equilíbrio (K_d) é calculada como a razão k_{off}/k_{on} . Vide, por exemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881.

[00130] Em outra modalidade, a interferometria de biocmada pode ser usada para determinar a afinidade de anticorpos anti-Siglec-8 contra Siglec-8. Em um ensaio exemplar, a proteína marcada com Siglec-8-Fc é imobilizada em sensores de captura anti-humanos e incubada com concentrações crescentes de fragmentos Fab, anti-Siglec-8 humanizado, quimérico ou humanizado para obter medições de afinidade usando um instrumento como, por exemplo, o Sistema Octet Red 384 (ForteBio).

[00131] A afinidade de ligação do anticorpo anti-Siglec-8 pode, por exemplo, também ser determinada pela análise de Scatchard descrita em Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980) utilizando técnicas padrão bem conhecidas na área relevante. Vide também Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660 (1947).

2. Avidéz do Anticorpo

[00132] Em algumas modalidades, a avidéz de ligação do anticorpo anti-Siglec-8 pode ser determinada por um ensaio de ressonância

plasmônica de superfície. Por exemplo, a K_d ou o valor K_d podem ser medidos usando um BIAcore T100. Os anticorpos de captura (por exemplo, cabra-anti-humano-Fc e cabra-anti-camundongo-Fc) são imobilizados em um chip CM5. As células de fluxo podem ser imobilizadas com anticorpos anti-humanos ou anticamundongos. O ensaio é realizado a uma certa temperatura e taxa de fluxo, por exemplo, a 25°C a uma taxa de fluxo de 30 μ l/min. O Siglec-8 dimérico é diluído em tampão de ensaio a várias concentrações, por exemplo, a uma concentração que varia de 15nM a 1,88pM. Os anticorpos são capturados e as injeções de alto desempenho são realizadas, seguidas de dissociações. As células de fluxo são regeneradas com um tampão, por exemplo, 50 mM de glicina, pH 1,5. Os resultados são apagados com uma célula de referência vazia e várias injeções de tampão de ensaio e analisadas com parâmetros de ajuste global 1:1.

3. Ensaio de Competição

[00133] Os ensaios de competição podem ser utilizados para determinar se dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo, reconhecendo epítopos idênticos ou sobrepostos estereoquimicamente ou se um anticorpo inibe competitivamente a ligação de outro anticorpo ao antígeno. Estes ensaios são conhecidos na técnica. Tipicamente, o antígeno ou células que expressam antígeno são imobilizados em uma placa de vários poços e a capacidade de anticorpos não marcados para bloquear a ligação de anticorpos marcados é medida. Etiquetas comuns para esses ensaios de competição são etiquetas radioativas ou etiquetas de enzimas. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito compete com um anticorpo 2E2 aqui descrito, pela ligação ao epítopo presente na superfície celular de uma célula (por exemplo, um mastócito). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito compete com um anticorpo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de

aminoácido de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO : 15, para ligação ao epítipo presente na superfície celular de uma célula (por exemplo, um mastócito). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito compete com um anticorpo 2C4 aqui descrito, pela ligação ao epítipo presente na superfície celular de uma célula (por exemplo, um mastócito). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito compete com um anticorpo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 (como encontrado na Patente US 8.207.305) e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 (como encontrada na Patente US 8.207.305), para ligação ao epítipo presente na superfície celular de uma célula (por exemplo, mastócitos).

4. Estabilidade Térmica

[00134] Em alguns aspectos, um anti-Siglec-8 aqui descrito tem uma temperatura de fusão (T_m) de pelo menos cerca de 70°C, pelo menos cerca de 71°C ou pelo menos cerca de 72°C em um ensaio de troca térmica. Em um ensaio de troca térmica exemplar, amostras compreendendo um anticorpo anti-Siglec-8 humanizado são incubadas com um corante fluorescente (Sypro Orange) por 71 ciclos com aumento de 1°C por ciclo em um termociclador qPCR para determinar a T_m . Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 tem um T_m similar ou superior em comparação com o anticorpo 2E2 de camundongo e/ou anticorpo 2C4 de camundongo. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16 ou 21. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 tem o mesmo ou T_m

maior em comparação com um anticorpo quimérico 2C4. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-Siglec-8 tem o mesmo ou maior T_m em comparação com um anticorpo com uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO : 85

5. Ensaios de Atividade Biológica

[00135] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito esgota os mastócitos. Os ensaios para avaliar a apoptose das células são bem conhecidos na técnica, por exemplo, coloração com anexina V e o ensaio TUNNEL.

[00136] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito induz a atividade ADCC. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito mata mastócitos que expressam Siglec-8 pela atividade do ADCC. Em algumas modalidades, uma composição compreende anticorpos anti-Siglec-8 não fucosilados (isto é, afucosilados). Em algumas modalidades, uma composição compreendendo anticorpos anti-Siglec-8 não fucosilados aqui descritos aumenta a atividade de ADCC em comparação com uma composição compreendendo anticorpos anti-Siglec-8 parcialmente fucosilados. Os ensaios para avaliar a atividade do ADCC são bem conhecidos na técnica e aqui descritos. Em um ensaio exemplar, para medir a atividade ADCC, são utilizadas células efectoras e células alvo. Exemplos de células efectoras incluem células assassinas naturais (NK), grandes linfócitos granulares (LGL), células assassinas ativadas por linfocinas (LAK) e PBMC compreendendo NK e LGL ou leucócitos com receptores Fc nas superfícies celulares, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. As células efectoras podem ser isoladas de qualquer fonte, incluindo indivíduos com uma doença de interesse (por exemplo, uma doença ocular alérgica). A célula alvo é qualquer célula que expressa na superfície celular antígenos que os anticorpos a serem avaliados possam

reconhecer. Um exemplo de uma célula alvo é um mastócito que expressa Siglec-8 na superfície celular. Outro exemplo de uma célula alvo é uma linhagem celular (por exemplo, linhagem celular de Ramos) que expressa Siglec-8 na superfície celular (por exemplo, Ramos 2C10)). As células alvo podem ser marcadas com um reagente que permite a detecção de citólise. Exemplos de reagentes para marcação incluem uma substância radioativa, como cromato de sódio ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$). Vide, por exemplo, *Immunology*, 14, 181 (1968); *J. Immunol. Methods*, 172, 227 (1994); e *J. Immunol. Methods*, 184, 29 (1995).

[00137] Em outro ensaio exemplar para avaliar a atividade ADCC e apoptótica de anticorpos anti-Siglec-8 em mastócitos, os mastócitos humanos são isolados de tecidos humanos ou fluidos biológicos de acordo com protocolos publicados (Guhl et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75: 382-384; Kulka et al., *In Current Protocols in Immunology*, 2001 (John Wiley & Sons, Inc.)) ou diferenciados de células-tronco hematopoiéticas humanas, por exemplo, como descrito por Yokoi et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2008, 121: 499-505. Os mastócitos purificados são ressuspensos em meio RPMI completo em uma placa de fundo U de 96 poços estéril e incubados na presença ou ausência de anticorpos anti-Siglec-8 por 30 minutos em concentrações variando entre 0,0001 ng/ml e 10 µg/ml. As amostras são incubadas por mais 4 a 48 horas com e sem células assassinas naturais (NK) purificadas ou PBL fresco para induzir ADCC. A morte celular por apoptose ou ADCC é analisada por citometria de fluxo usando anticorpos conjugados fluorescentes para detectar mastócitos (CD117 e FcγR1) e anexina-V e 7AAD para discriminar células vivas e mortas ou moribundas. A coloração com anexina V e 7AAD é realizada de acordo com as instruções do fabricante.

[00138] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito inibe atividades mediadas por mastócitos. A triptase dos mastócitos tem

sido usada como um biomarcador para o número total de mastócitos e a ativação. Por exemplo, a triptase total e ativa, bem como a histamina, N-metil histamina e 11-beta-prostaglandina F2 podem ser medidas no sangue ou na urina para avaliar a redução nos mastócitos. Vide, por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente US No. 20110293631 para um exemplo de ensaio de atividade de mastócitos.

E. Preparação de Anticorpo

[00139] O anticorpo aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) é preparado usando técnicas disponíveis na área para gerar anticorpos, métodos exemplares dos quais são descritos em mais detalhes nas seções a seguir.

1. Fragmentos de Anticorpo

[00140] A presente divulgação abrange fragmentos de anticorpo. Os fragmentos de anticorpos podem ser gerados por meios tradicionais, como digestão enzimática, ou por técnicas recombinantes. Em certas circunstâncias, há vantagens em usar fragmentos de anticorpos, em vez de anticorpos inteiros. Para uma revisão de certos fragmentos de anticorpos, consulte Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9: 129-134.

[00141] Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados por digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical e Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); e Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). No entanto, esses fragmentos agora podem ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpos Fab, Fv e ScFv podem todos ser expressos e secretados a partir de *E. coli*, permitindo assim a produção fácil de grandes quantidades desses fragmentos. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de

E. coli e acoplados quimicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio / Technology 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente da cultura de células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ com meia-vida aumentada *in vivo* compreendendo resíduos do epítopo de ligação ao receptor de recuperação são descritos na Patente U.S. No. 5.869.046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para o especialista. Em certas modalidades, um anticorpo é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Vide WO 93/16185; Pat. 5.571.894; e 5.587.458. Fv e scFv são as únicas espécies com sítios de combinação intactos e desprovidos de regiões constantes; assim, eles podem ser adequados para ligação não específica reduzida durante o uso *in vivo*. As proteínas de fusão scFv podem ser construídas para produzir a fusão de uma proteína efetora no terminal amino ou no terminal carboxi de um scFv. Vide Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. O fragmento de anticorpo também pode ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na Patente U.S. No. 5.641.870, por exemplo. Tais anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

2. Anticorpos Humanizados

[00142] A presente divulgação abrange anticorpos humanizados. Vários métodos para humanizar anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que geralmente são retirados de um domínio variável "de importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter (Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:

1534-1536), substituindo sequências da região hipervariável pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Por conseguinte, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. No. 4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de locais análogos nos anticorpos de roedores.

[00143] A escolha de domínios variáveis humanos, leves e pesados, a serem utilizados na produção de anticorpos humanizados pode ser importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor (por exemplo, camundongo) é rastreada contra toda a biblioteca de sequências conhecidas de domínio variável humano. A sequência humana que é mais próxima daquela do roedor é então aceita como estrutura humana para o anticorpo humanizado (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Outro método utiliza uma estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

[00144] Além disso, é geralmente desejável que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e de vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais

das sequências parenteral e humanizada. Modelos tridimensionais de imunoglobulina estão geralmente disponíveis e são familiares para aqueles versados na técnica. Programas de computador estão disponíveis os quais ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu antígeno. Deste modo, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptoras e de importação, para que seja alcançada a característica desejada do anticorpo, como maior afinidade pelo antígeno (s) alvo. Em geral, os resíduos da região hipervariável são diretos e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

3. Anticorpos Humanos

[00145] Os anticorpos humanos anti-Siglec-8 da presente divulgação podem ser construídos combinando sequência (s) de domínio variável do clone Fv selecionada a partir de bibliotecas de exibição de fagos derivados de humanos com sequências conhecidas de domínio constante humano. Alternativamente, os anticorpos monoclonais humanos anti-Siglec-8 da presente divulgação podem ser produzidos pelo método de hibridoma. As linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano-camundongo para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas, por exemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques e Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987); e Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

[00146] É possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produ-

ção endógena de imunoglobulina. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção de cadeia pesada (JH) de anticorpo em camundongos mutantes quiméricos e de linhagem germinativa resulta em inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência da matriz gênica da imunoglobulina da linhagem germinativa humana nesses camundongos mutantes de linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos por desafio ao antígeno. Vide, por exemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

[00147] O embaralhamento de genes também pode ser usado para derivar anticorpos humanos de anticorpos não humanos (por exemplo, roedores), onde o anticorpo humano tem afinidades e especificidades similares ao anticorpo não humano inicial. De acordo com esse método, também chamado de "impressão de epítipo", a região variável de cadeia pesada ou leve de um fragmento de anticorpo não humano obtido por técnicas de exibição de fagos, conforme descrito aqui, é substituída por um repertório de genes do domínio V humano, criando uma população de quimeras de cadeia não humana / cadeia humana scFv ou Fab. A seleção com antígeno resulta no isolamento de um scFv quimérico ou Fab de cadeia não humana / cadeia humana, em que a cadeia humana restaura o sítio de ligação ao antígeno destruído após a remoção da cadeia não humana correspondente no clone de exibição do fago primário, ou seja, o epítipo governa a escolha do parceiro da cadeia humana. Quando o processo é repetido para substituir a cadeia não humana restante, é obtido um anticorpo humano (vide PCT WO 93/06213 publicado em 1 de abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos não humanos por enxerto de CDR, esta técnica fornece anticorpos completamente humanos, que não têm resíduos de FR ou CDR de origem não humana.

4. Anticorpos Biespecíficos

[00148] Anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais que têm especificidades de ligação a pelo menos dois antígenos diferentes. Em certas modalidades, os anticorpos biespecíficos são anticorpos humanos ou humanizados. Em certas modalidades, uma das especificidades de ligação é a Siglec-8 e a outra é a qualquer outro antígeno. Em certas modalidades, os anticorpos biespecíficos podem se ligar a dois epítomos diferentes de Siglec-8. Anticorpos biespecíficos também podem ser utilizados para localizar agentes citotóxicos em células que expressam Siglec-8. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos completos ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$).

[00149] Os métodos para produzir anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Vide Milstein e Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983), WO 93/08829, publicado em 13 de maio de 1993, e Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991). Para mais detalhes sobre a geração de anticorpos biespecíficos, vide, por exemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986). Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina. Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos usando qualquer método conveniente de reticulação. Agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica e são divulgados na Patente U.S. 4.676.980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

5. Anticorpos de Domínio Único

[00150] Em algumas modalidades, um anticorpo da presente divulgação é um anticorpo de domínio único. Um anticorpo de domínio único é uma cadeia simples de polipeptídeo compreendendo todo ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada ou todo ou uma porção do domínio variável de cadeia leve de um anticorpo. Em certas moda-

lidades, um anticorpo de domínio único é um anticorpo humano de domínio único (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; vide, por exemplo, a Patente U.S. No. 6.248.516 B1). Em uma modalidade, um anticorpo de domínio único consiste em todo ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada de um anticorpo.

6. Variantes de Anticorpo

[00151] Em algumas modalidades, as modificações na sequência de aminoácido dos anticorpos aqui descritos são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de aminoácido do anticorpo podem ser preparadas através da introdução de alterações apropriadas na sequência de nucleotídeo que codifica o anticorpo ou por síntese de peptídeo. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácido do anticorpo. Qualquer combinação de exclusão, inserção e substituição pode ser feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácido do anticorpo em questão no momento em que a sequência é feita.

[00152] Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são locais preferidos para a mutagênese é chamado "mutagênese de varredura de alanina", como descrito por Cunningham e Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados, como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (por exemplo, alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Aquelas localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas através da introdução

de outras variantes ou adicionais nos ou aos locais de substituição. Assim, embora o local para a introdução de uma variação da sequência de aminoácido seja predeterminado, a natureza da mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um determinado local, a varredura de ala ou mutagênese aleatória é realizada no códon ou região alvo e as imunoglobulinas expressas são rastreadas quanto à atividade desejada.

[00153] As inserções de sequência de aminoácido incluem fusões de terminais amino e/ou carboxila que variam em comprimento de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequentes de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionila N-terminal. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-terminal do anticorpo com uma enzima ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

[00154] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais têm uma clivagem do C-terminal na cadeia pesada e/ou cadeia leve. Por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos são clivados no C-terminal da cadeia pesada e/ou cadeia leve. Em algumas modalidades, a clivagem do C-terminal remove uma lisina do C-terminal da cadeia pesada. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais têm uma clivagem no N-terminal na cadeia pesada e/ou cadeia leve. Por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos são clivados no N-terminal da cadeia pesada e/ou cadeia leve. Em algumas modalidades, formas truncadas de anticorpos monoclonais podem ser feitas por técnicas recombinantes.

[00155] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação é alterado para aumentar ou diminuir a extensão em que o anticorpo é glicosilado. A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente ligada a N ou ligada a O. Ligado a N refere-se à ligação de uma porção de

carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências de tripeptídeos em um polipeptídeo cria um potencial local de glicosilação. A glicosilação ligada ao O refere-se à ligação de um dos açúcares N-aceilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidróxi-aminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora também possa ser usada a 5-hidroxiprolina ou a 5-hidroxilisina.

[00156] A adição ou exclusão de sítios de glicosilação ao anticorpo é convenientemente realizada alterando a sequência de aminoácido de modo que uma ou mais das sequências de tripeptídeos descritas acima (para sítios de glicosilação ligadas a N) sejam criadas ou removidas. A alteração também pode ser feita pela adição, exclusão ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação ligados a O).

[00157] Onde o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato ligado ao mesmo pode ser alterado. Por exemplo, os anticorpos com uma estrutura de carboidratos madura que carece de fucose ligada a uma região Fc do anticorpo são descritos na Patente U.S. No. US 2003/0157108 (Presta, L.). Vide também US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Os anticorpos com uma N-acetilglucosamina bissectada (GlcNAc) no carboidrato ligado a uma região Fc do anticorpo são referenciados no documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. e Pat. No. 6.602.684, Umana et al. Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado a uma região Fc do anticorpo são relatados em WO 1997/30087, Patel et al. Vide também WO 1998/58964 (Raju, S.) e WO 1999/22764 (Raju, S.) sobre anticorpos com carboidrato alterado ligado à sua região Fc. Vide também US

2005/0123546 (Umana et al.) Em moléculas de ligação a antígeno com glicosilação modificada.

[00158] Em certas modalidades, uma variante de glicosilação compreende uma região Fc, em que uma estrutura de carboidrato ligada à região Fc não tem fucose. Tais variantes melhoraram a função ADCC. Opcionalmente, a região Fc compreende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos nela que melhoram ainda mais a ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração Eu de resíduos). Exemplos de publicações relacionadas a anticorpos "defucosilados" ou "deficientes em fucose" incluem: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotechnologia. Bioeng. 87: 614 (2004). Exemplos de linhagens celulares que produzem anticorpos desfucosilados incluem células Lec13 CHO deficientes em fucosilação de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); pedido de patente norte-americano US 2003/0157108 A1, Presta, L; e WO 2004/056312 A1, Adams et al., Especialmente no Exemplo 11), e linhagens celulares knockout, como o gene de alfa-1,6-fucosiltransferase, FUT8, células CHO knockout (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)) e células que superexpressam a β 1,4-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) e μ -manosidase II de Golgi (ManII).

[00159] Anticorpos são contemplados aqui, os quais reduziram a fucose em relação à quantidade de fucose no mesmo anticorpo produzido em uma célula CHO do tipo selvagem. Por exemplo, o anticorpo tem uma quantidade mais baixa de fucose do que seria produzido por células CHO nativas (por exemplo, uma célula CHO que produz um

padrão de glicosilação nativa, como uma célula CHO contendo um gene FUT8 nativo). Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui fornecido é aquele em que menos de cerca de 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% dos glicanos ligados a N dos mesmos compreendem fucose. Em certas modalidades, um anticorpo anti-Siglec-8 aqui fornecido é aquele em que nenhum dos glicanos ligados a N nele compreende fucose, isto é, em que o anticorpo está completamente sem fucose ou não tem fucose ou não é fucosilado ou é afucosilado. A quantidade de fucose pode ser determinada calculando a quantidade média de fucose dentro da cadeia de açúcar em Asn297, em relação à soma de todas as glicoestruturas ligadas ao Asn297 (por exemplo, estruturas complexas, híbridas e de alta manose), medidas pela espectrometria de massa MALDI-TOF, como descrito em WO 2008/077546, por exemplo. Asn297 refere-se ao resíduo de asparagina localizado na posição 297 na região Fc (numeração EU de resíduos da região Fc); No entanto, Asn297 também pode estar localizado a cerca de ± 3 aminoácidos a montante ou a jusante da posição 297, isto é, entre as posições 294 e 300, devido a pequenas variações de sequência nos anticorpos. Em algumas modalidades, pelo menos uma ou duas das cadeias pesadas do anticorpo não são fucosiladas.

[00160] Em uma modalidade, o anticorpo é alterado para melhorar sua meia-vida sérica. Para aumentar a meia-vida sérica do anticorpo, pode-se incorporar um epítopo de ligação ao receptor de recuperação no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito na Patente US 5.739.277, por exemplo. Como usado aqui, o termo "epítopo de ligação ao receptor de recuperação" refere-se a um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) responsável por aumentar a meia-vida sérica *in vivo* da molécula de IgG (US 2003/0190311, patente US 6,821,505; patente US 6,165,745; patente US 5,624,821; patente US 5.648.260;

patente US 6.165,745; patente US 5.834.597).

[00161] Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Essas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Sítios de interesse para a mutagênese substitucional incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações na FR também são contempladas. As substituições conservadoras são mostradas na Tabela 5, sob o título "substituições preferidas". Se essas substituições resultarem em uma mudança desejável na atividade biológica, então mudanças mais substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 5, ou conforme descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos selecionados.

Tabela 5

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[00162] Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são realizadas selecionando substituições que diferem significativamente em seus efeitos na manutenção (a) da estrutura do esqueleto principal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma folha ou conformação helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou c) a maior parte da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as semelhanças nas propriedades de suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, em *Biochemistry*, segunda ed., Pp. 73-75, Worth Publishers, Nova York (1975)):

(1) não polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar não carregado: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H)

[00163] Alternativamente, os resíduos que ocorrem naturalmente podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

(1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[00164] Substituições não conservadoras implicarão na troca de um membro de uma dessas classes por outra classe. Esses resíduos substituídos também podem ser introduzidos nos sítios de substituição conservadora ou nos sítios restantes (não conservados).

[00165] Um tipo de variante substitucional envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a variante (s) resultante selecionada para desenvolvimento adicional terá propriedades biológicas modificadas (por exemplo, melhoradas) em relação ao anticorpo parental a partir do qual são geradas. Uma maneira conveniente de gerar essas variantes substitucionais envolve a maturação por afinidade usando a exibição de fagos. Resumidamente, vários sítios da região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) são mudados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácidos em cada sítio. Os anticorpos assim gerados são exibidos a partir de partículas de fagos filamentosos como fusões para pelo menos parte de uma proteína de revestimento de fagos (por exemplo, o produto do gene III de M13) empacotado dentro de cada partícula. As variantes exibidas em fagos são então pesquisadas quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação). A fim de identificar os sítios candidatos de região hipervariável para modificação, a mutagênese da varredura (por exemplo, varredura de alanina) pode ser realizada para identificar resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos à substituição de acordo com as técnicas conhecidas na técnica, incluindo as aqui elaboradas. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à triagem usando técnicas conhecidas na área, incluindo as aqui descritas, e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

[00166] As moléculas de ácido nucleico que codificam variantes da

sequência de aminoácido do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido que ocorrem naturalmente) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou dirigida ao sítio), mutagênese por PCR e mutagênese de cassete de uma amostra anterior variante preparada ou uma versão não variante do anticorpo.

[00167] Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos em uma região Fc dos anticorpos da presente divulgação, gerando assim uma variante da região Fc. A variante da região Fc pode compreender uma sequência da região Fc humana (por exemplo, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácidos (por exemplo, uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácidos, incluindo a de uma cisteína de charneira. Em algumas modalidades, a variante da região Fc compreende uma região Fc de IgG4 humana. Em uma outra modalidade, o a região Fc de IgG4 humana compreende a substituição de aminoácidos S228P, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice EU como em Kabat.

[00168] De acordo com esta descrição e os ensinamentos da técnica, é contemplado que, em algumas modalidades, um anticorpo da presente divulgação possa compreender uma ou mais alterações em comparação com o anticorpo de contrapartida do tipo selvagem, por exemplo, na região Fc. No entanto, estes anticorpos reteriam substancialmente as mesmas características necessárias para a utilidade terapêutica em comparação com o seu homólogo do tipo selvagem. Por exemplo, pensa-se que certas alterações podem ser feitas na região Fc que resultariam em ligação a C1q alterada (isto é, melhorada ou diminuída) e/ou Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC), por

exemplo, como descrito em WO99/51642. Vide também Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); Pat. No. 5.648.260; Pat. No. 5.624.821; e WO94/29351 em relação a outros exemplos de variantes da região Fc. Os documentos WO00/42072 (Presta) e WO 2004/056312 (Lowman) descrevem variantes de anticorpos com ligação melhorada ou diminuída a FcRs. O conteúdo dessas publicações de patentes é especificamente incorporado aqui por referência. Vide também Shields et al. J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001). Anticorpos com meia-vida aumentada e ligação melhorada ao receptor Fc neonatal (FcRn), responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) e Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), são descritos em US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estes anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições nela que melhoram a ligação da região Fc ao FcRn. Variantes polipeptídicas com sequências de aminoácido da região Fc alteradas e capacidade de ligação de C1q aumentada ou diminuída são descritas na Pat. No. 6.194.551B1, WO99/51642. O conteúdo dessas publicações de patentes é especificamente incorporado aqui por referência. Vide também Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

7. Vetores, células hospedeiras e métodos recombinantes

[00169] Para produção recombinante de um anticorpo da presente divulgação, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido em um vetor replicável para posterior clonagem (amplificação do DNA) ou para expressão. O DNA que codifica o anticorpo é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. A escolha do vetor depende em parte da célula hospedeira a ser usada. Geralmente, as células hospedeiras são de origem procariótica ou eucariótica (geralmente mamí-

fera). Deverá ser apreciado que regiões constantes de qualquer isótipo podem ser utilizadas para este fim, incluindo regiões constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e que essas regiões constantes podem ser obtidas de qualquer espécie humana ou animal.

Geração de Anticorpos Usando Células Hospedeiras Procarióticas:

a) Construção vetorial

[00170] Sequências de polinucleotídeos que codificam componentes de polipeptídeo do anticorpo da presente divulgação podem ser obtidas usando técnicas recombinantes padrão. As sequências polinucleotídicas desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de anticorpos, como células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser sintetizados usando sintetizador de nucleotídeos ou técnicas de PCR. Uma vez obtidas, as sequências que codificam os polipeptídeos são inseridas em um vetor recombinante capaz de replicar e expressar polinucleotídeos heterólogos em hospedeiros procarióticos. Muitos vetores que estão disponíveis e conhecidos na técnica podem ser utilizados para os fins da presente divulgação. A seleção de um vetor apropriado dependerá principalmente do tamanho dos ácidos nucleicos a serem inseridos no vetor e da célula hospedeira específica a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém vários componentes, dependendo de sua função (amplificação ou expressão de polinucleotídeo heterólogo, ou ambos) e de sua compatibilidade com a célula hospedeira específica em que reside. Os componentes do vetor geralmente incluem, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação ao ribossomo (RBS), uma sequência de sinal, a inserção heteróloga de ácido nucleico e uma sequência de terminação da transcrição.

[00171] Em geral, os vetores de plasmídeo contendo sequências de replicon e controle que são derivadas de espécies compatíveis com a

célula hospedeira são utilizados em conexão com esses hospedeiros. O vetor normalmente leva um sítio de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de fornecer seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada usando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. O pBR322 contém resistência à ampicilina (Amp) e à tetraciclina (Tet) que codifica genes e, portanto, fornece meios fáceis para identificar células transformadas. O pBR322, seus derivados ou outros plasmídeos ou bacteriófagos microbianos também podem conter ou ser modificados conter promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados de pBR322 utilizados para expressão de anticorpos particulares são descritos em detalhe em Carter et al., Pat. No. 5.648.237.

[00172] Além disso, vetores de fagos contendo sequências de replicon e controle que são compatíveis com o micro-organismo hospedeiro podem ser utilizados como vetores de transformação em conexão com esses hospedeiros. Por exemplo, bacteriófagos como λ GEM.TM.-11 podem ser utilizados na produção de um vetor recombinante que pode ser usado para transformar células hospedeiras suscetíveis, como *E. coli* LE392.

[00173] O vetor de expressão da presente divulgação pode compreender dois ou mais pares promotor-cístron, codificando cada um dos componentes do polipeptídeo. Um promotor é uma sequência reguladora não traduzida localizada a montante (5') para um cístron que modula sua expressão. Os promotores procarióticos tipicamente se enquadram em duas classes, induzíveis e constitutivas. O promotor induzível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do cístron sob seu controle em resposta a alterações na condição de cultura, por exemplo, presença ou ausência de um nutriente ou mudança de temperatura.

[00174] Um grande número de promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras em potencial é bem conhecido. O promotor selecionado pode ser operacionalmente ligado ao DNA do cístron que codifica a cadeia leve ou pesada, removendo o promotor do DNA fonte via digestão com enzima de restrição e inserindo a sequência do promotor isolado no vetor da presente divulgação. Tanto a sequência do promotor nativo como muitos promotores heterólogos podem ser utilizados para direcionar a amplificação e/ou expressão dos genes alvo. Em algumas modalidades, são utilizados promotores heterólogos, pois geralmente permitem maior transcrição e maiores rendimentos do gene alvo expresso em comparação com o promotor do polipeptídeo alvo nativo.

[00175] Os promotores adequados para uso com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas promotor PhoA, sistemas promotores de β -galactamase e lactose, um sistema promotor de triptofano (trp) e promotores híbridos, como o promotor tac ou trc. No entanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (como outros promotores conhecidos de bactérias ou fagos) também são adequados. Suas sequências de nucleotídeos foram publicadas, permitindo assim que um trabalhador qualificado as ligue operacionalmente a cístrons que codificam as cadeias leve e pesada alvo (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) usando ligantes ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários.

[00176] Em um aspecto da presente divulgação, cada cístron dentro do vetor recombinante compreende um componente de sequência de sinal de secreção que direciona a translocação dos polipeptídeos expressos através de uma membrana. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vetor ou pode ser uma parte do DNA do polipeptídeo alvo que é inserido no vetor. A sequência de sinal selecionada para os fins da presente divulgação deve ser aquela que é re-

conhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam as sequências de sinal nativas dos polipeptídeos heterólogos, a sequência de sinal é substituída por uma sequência de sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo que consiste na fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou líderes de enterotoxina II termicamente estável (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Em uma modalidade da presente divulgação, as sequências de sinal usadas em ambos os cístrons do sistema de expressão são sequências de sinal STII ou variantes das mesmas.

[00177] Em outro aspecto, a produção das imunoglobulinas de acordo com a presente divulgação pode ocorrer no citoplasma da célula hospedeira e, portanto, não requer a presença de sequências de sinal de secreção dentro de cada cístron. A este respeito, as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina são expressas, dobradas e montadas para formar imunoglobulinas funcionais no citoplasma. Certas cepas hospedeiras (por exemplo, cepas de *E. coli* trxB) proporcionam condições citoplasmáticas favoráveis à formação de ligações dissulfureto, permitindo assim desdobramento e montagem adequada das subunidades proteicas expressas. Proba e Pluckthun *Gene*, 159: 203 (1995).

[00178] Os anticorpos da presente divulgação também podem ser produzidos usando um sistema de expressão no qual a razão quantitativa de componentes polipeptídicos expressos pode ser modulada a fim de maximizar o rendimento de anticorpos secretados e adequadamente montados da presente divulgação. Essa modulação é realizada pelo menos em parte pela modulação simultânea das forças traducionais dos componentes do polipeptídeo.

[00179] Uma técnica para modular a força de tradução é divulgada em Simmons et al., Pat. No. 5.840.523. Ele utiliza variantes da região

de iniciação translacional (TIR) dentro de um cístron. Para um determinado TIR, uma série de variantes de sequência de aminoácido ou ácidos nucleicos pode ser criada com uma variedade de forças de tradução, fornecendo assim um meio conveniente pelo qual ajustar esse fator para o nível de expressão desejado da cadeia específica. As variantes TIR podem ser geradas por técnicas convencionais de mutagênese que resultam em alterações de códons que podem alterar a sequência de aminoácido. Em certas modalidades, as alterações na sequência de nucleotídeos são silenciosas. Alterações no TIR podem incluir, por exemplo, alterações no número ou espaçamento das sequências Shine-Dalgarno, juntamente com alterações na sequência do sinal. Um método para gerar sequências de sinal mutantes é a geração de um "banco de códons" no início de uma sequência de codificação que não altera a sequência de aminoácido da sequência de sinal (ou seja, as alterações são silenciosas). Isto pode ser conseguido alterando a posição do terceiro nucleotídeo de cada códon; além disso, alguns aminoácidos, como leucina, serina e arginina, têm várias primeira e segunda posições que podem adicionar complexidade ao fazer o banco. Este método de mutagênese é descrito em detalhes em Yansura et al. (1992) MÉTODOS: Um companheiro para métodos em Enzymol. 4: 151-158.

[00180] Em uma modalidade, um conjunto de vetores é gerado com uma gama de forças TIR para cada cístron no mesmo. Este conjunto limitado fornece uma comparação dos níveis de expressão de cada cadeia, bem como o rendimento dos produtos de anticorpos desejados sob várias combinações de força de TIR. As forças de TIR podem ser determinadas quantificando o nível de expressão de um gene repórter como descrito em detalhes em Simmons et al. Pat. No. 5.840.523. Com base na comparação da força de tradução, os TIRs individuais desejados são selecionados para serem combinados nas construções

de vetor de expressão da presente divulgação.

[00181] As células hospedeiras procarióticas adequadas para expressar anticorpos da presente divulgação incluem Archaeobacteria e Eubacteria, como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por exemplo, *B. subtilis*), Enterobactérias, espécies de *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* ou *Paracoccus*. Em uma modalidade, são utilizadas células gram-negativas. Em uma modalidade, as células de *E. coli* são usadas como hospedeiros para a presente divulgação. Exemplos de linhagens de *E. coli* incluem a linhagem W3110 (Bachmann, *Cellular e Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; depósito ATCC No. 27.325) e seus derivados, incluindo cepa 33D3 com o genótipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kRR (Patente US No. 5.639.635). Outras cepas e seus derivados, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) e *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) também são adequadas. Esses exemplos são ilustrativos e não limitativos. Os métodos para a construção de derivados de qualquer uma das bactérias acima mencionadas tendo genótipos definidos são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990). É geralmente necessário selecionar as bactérias apropriadas, levando em consideração a replicabilidade do replicon nas células de uma bactéria. Por exemplo, as espécies de *E. coli*, *Serratia* ou *Salmonella* podem ser adequadamente utilizadas como hospedeiro quando plasmídeos bem conhecidos, como pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410, são usados para fornecer a replicação. Tipicamente, a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores adicionais de protease podem ser de-

sejáveis ser incorporados na cultura celular.

b) Produção de anticorpos

[00182] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão descritos acima e cultivadas em meio nutriente convencional modificado conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

[00183] Transformação significa introduzir DNA no hospedeiro procariótico, de modo que o DNA seja replicável, como um elemento extracromossômico ou como integrante cromossômico. Dependendo da célula hospedeira usada, a transformação é feita usando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio que emprega cloreto de cálcio é geralmente usado para células bacterianas que contêm barreiras substanciais à parede celular. Outro método para transformação emprega polietileno glicol / DMSO. Ainda outra técnica usada é a eletroporação.

[00184] As células procarióticas usadas para produzir os polipeptídeos da presente divulgação são cultivadas em meios conhecidos na técnica e adequadas para a cultura das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meios adequados incluem caldo de luria (LB) mais suplementos nutricionais necessários. Em algumas modalidades, o meio também contém um agente de seleção, escolhido com base na construção do vetor de expressão, para permitir seletivamente o crescimento de células procarióticas contendo o vetor de expressão. Por exemplo, a ampicilina é adicionada ao meio para crescimento de células que expressam o gene resistente à ampicilina.

[00185] Quaisquer suplementos necessários além de fontes de carbono, nitrogênio e fosfato inorgânico também podem ser incluídos em concentrações apropriadas introduzidas isoladamente ou como uma mistura com outro suplemento ou meio, como uma fonte complexa de

nitrogênio. Opcionalmente, o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores selecionados do grupo que consiste em glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditioneitol.

[00186] As células hospedeiras procarióticas são cultivadas a temperaturas adequadas. Em certas modalidades, para o crescimento de *E. coli*, as temperaturas de crescimento variam de cerca de 20°C a cerca de 39°C; de cerca de 25°C a cerca de 37°C; ou cerca de 30°C. O pH do meio pode ser qualquer pH variando entre cerca de 5 e cerca de 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Em certas modalidades, para *E. coli*, o pH é de cerca de 6,8 a cerca de 7,4 ou cerca de 7,0.

[00187] Se um promotor induzível for usado no vetor de expressão da presente divulgação, a expressão da proteína é induzida sob condições adequadas para a ativação do promotor. Em um aspecto da presente divulgação, os promotores de *PhoA* são usados para controlar a transcrição dos polipeptídeos. Por conseguinte, as células hospedeiras transformadas são cultivadas em um meio limitador de fosfato para indução. Em certas modalidades, o meio limitador de fosfato é o meio C.R.A.P. (vide, por exemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). Uma variedade de outros indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção vetorial empregada, como é conhecido na técnica.

[00188] Em uma modalidade, os polipeptídeos expressos da presente divulgação são secretados e recuperados do periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteínas normalmente envolve a interrupção do micro-organismo, geralmente por meios como choque osmótico, sonicação ou lise. Depois que as células são interrompidas, os detritos celulares ou células inteiras podem ser removidos por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser ainda purificadas, por exemplo, por cromatografia em resina de afinidade. Alternativamente,

as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultura e isoladas no mesmo. As células podem ser removidas da cultura e o sobrenadante da cultura sendo filtrado e concentrado para purificação adicional das proteínas produzidas. Os polipeptídeos expressos podem ser ainda mais isolados e identificados usando métodos comumente conhecidos, como eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio de Western blot.

[00189] Em um aspecto da presente divulgação, a produção de anticorpos é conduzida em grande quantidade por um processo de fermentação. Estão disponíveis vários procedimentos de fermentação em lote alimentado em larga escala para a produção de proteínas recombinantes. As fermentações em larga escala têm pelo menos 1000 litros de capacidade e, em certas modalidades, cerca de 1.000 a 100.000 litros de capacidade. Esses fermentadores usam impulsores agitadores para distribuir oxigênio e nutrientes, especialmente glicose. A fermentação em pequena escala refere-se geralmente à fermentação em um fermentador que não tem mais do que aproximadamente 100 litros em capacidade volumétrica e pode variar de cerca de 1 litro a cerca de 100 litros.

[00190] Em um processo de fermentação, a indução da expressão de proteínas é tipicamente iniciada após o crescimento das células em condições adequadas para uma densidade desejada, por exemplo, um OD550 de cerca de 180-220, momento em que as células estão na fase estacionária inicial. Uma variedade de indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção vetorial empregada, como é conhecido na técnica e descrito acima. As células podem ser cultivadas por períodos mais curtos antes da indução. As células são geralmente induzidas por cerca de 12-50 horas, embora um tempo de indução mais longo ou mais curto possa ser usado.

[00191] Para melhorar o rendimento de produção e a qualidade dos

polipeptídeos da presente divulgação, várias condições de fermentação podem ser modificadas. Por exemplo, para melhorar a montagem e dobramento adequados dos polipeptídeos de anticorpo secretados, vetores adicionais superexpressam proteínas chaperonas, como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e ou DsbG) ou FkpA (peptidilprolil cis, trans-isomerase com chaperona atividade) pode ser usada para co-transformar as células procarióticas do hospedeiro. Demonstrou-se que as proteínas acompanhantes facilitam o desdobramento e a solubilidade adequados de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 19601-19605; Georgiou et al., Pat. 6.083.715; Georgiou et al., Pat. 6.027.888; Bothmann e Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm e Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

[00192] Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente aquelas que são proteoliticamente sensíveis), certas cepas hospedeiras deficientes em enzimas proteolíticas podem ser usadas para a presente divulgação. Por exemplo, as cepas de células hospedeiras podem ser modificadas para efetuar mutações genéticas nos genes que codificam proteases bacterianas conhecidas, como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease Mi, Protease V, Protease VI e combinações dos mesmos. Alguns E. estirpes deficientes em coli protease estão disponíveis e descritas em, por exemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Pat. No. 5.264.365; Georgiou et al., Pat. No. 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

[00193] Em uma modalidade, cepas de E. coli deficientes para enzimas proteolíticas e transformadas com plasmídeos que superexpressam uma ou mais proteínas chaperonas são usadas como células hospedeiras no sistema de expressão da presente divulgação.

c) Purificação de Anticorpos

[00194] Em uma modalidade, a proteína anticorpo aqui produzida é ainda purificada para obter preparações que são substancialmente homogêneas para ensaios e usos adicionais. Podem ser empregues métodos padrão de purificação de proteínas conhecidos na técnica. Os procedimentos a seguir são exemplificativos de procedimentos de purificação adequados: fracionamento em colunas de imunoafinidade ou de troca iônica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou em uma resina de troca catiônica como DEAE, cromatofoco, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amônio, e filtração em gel usando, por exemplo, Sephadex G-75.

[00195] Em um aspecto, a proteína A imobilizada em uma fase sólida é usada para purificação por imunoafinidade dos produtos de anticorpos da presente divulgação. A proteína A é uma proteína da parede celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se liga com uma alta afinidade à região Fc dos anticorpos. Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. A fase sólida na qual a proteína A está imobilizada pode ser uma coluna compreendendo uma superfície de vidro ou sílica, ou uma coluna de vidro de poro controlado ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna é revestida com um reagente, como glicerol, para possivelmente impedir a aderência inespecífica de contaminantes.

[00196] Como a primeira etapa da purificação, uma preparação derivada da cultura celular como descrita acima pode ser aplicada a uma fase sólida imobilizada da proteína A para permitir a ligação específica do anticorpo de interesse à proteína A. A fase sólida deve ser lavada remover contaminantes não especificamente ligados à fase sólida. Finalmente, o anticorpo de interesse é recuperado da fase sólida por eluição.

Geração de Anticorpos Usando Células Hospedeiras Eucarióticas:

[00197] Um vetor para uso em uma célula hospedeira eucariótica

geralmente inclui um ou mais dos seguintes componentes não limitativos: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor e uma transcrição sequência de terminação.

a) Componente de Sequência de Sinal

[00198] Um vetor para uso em uma célula hospedeira eucariótica também pode conter uma sequência de sinal ou outro polipeptídeo que tem um local de clivagem específico no N-terminal da proteína madura ou polipeptídeo de interesse. A sequência de sinal heteróloga selecionada pode ser uma que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Na expressão de células de mamíferos, estão disponíveis sequências de sinal de mamífero, bem como líderes secretores virais, por exemplo, o sinal gD do herpes simplex. O DNA para essa região precursora é ligado no quadro de leitura ao DNA que codifica o anticorpo.

b) Origem da Replicação

[00199] Geralmente, uma origem do componente de replicação não é necessária para vetores de expressão em mamíferos. Por exemplo, a origem SV40 normalmente pode ser usada apenas porque contém o promotor inicial.

c) Componente do gene de seleção

[00200] Os vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também denominado marcador selecionável. Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, quando relevantes, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos.

[00201] Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um medicamento para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. As

células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência ao medicamento e, assim, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos dessa seleção dominante usam os medicamentos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[00202] Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para absorver o ácido nucleico do anticorpo, como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e -II, genes de primatas metalotioneína, adenosina desaminase, descarboxilase de ornitina, etc.

[00203] Por exemplo, em algumas modalidades, as células transformadas com o gene de seleção DHFR são primeiro identificadas pela cultura de todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo do DHFR. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira apropriada quando DHFR de tipo selvagem é empregada é a linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente na atividade de DHFR (por exemplo, ATCC CRL-9096).

[00204] Alternativamente, as células hospedeiras (principalmente hospedeiros do tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformaram ou cotransformaram com sequências de DNA que codificam um anticorpo, proteína DHFR do tipo selvagem e outro marcador selecionável, como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH) pode ser selecionado pelo crescimento celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável, como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina ou G418. Vide Pat. 4.965.199. As células hospedeiras podem incluir NS0, CHOK1, CHOK1SV ou derivados, incluindo linhagens celulares deficientes em glutamina sintetase (GS). Os métodos para o uso de GS como um

marcador selecionável para células de mamíferos são descritos na Pat. No. 5.122.464 e Pat. No. 5.891.693.

d) Componente de Promotor

[00205] Os vetores de expressão e de clonagem geralmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de interesse (por exemplo, um anticorpo). Sequências promotoras são conhecidas para eucariotas. Por exemplo, praticamente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada de 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. No extremo 3' da maioria dos genes eucarióticos, há uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli A na extremidade 3' da sequência de codificação. Em certas modalidades, qualquer uma ou todas essas sequências podem ser adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

[00206] A transcrição de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir de genomas de vírus como vírus de polioma, vírus da varíola, adenovírus (como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e vírus Simian 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas celulares.

[00207] Os promotores iniciais e tardios do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição SV40 que também contém a origem viral de replicação do SV40. O promotor imedia-

to inicial do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressar DNA em hospedeiros de mamíferos usando o vírus do papiloma bovino como vetor é divulgado na Pat. 4.419.446. Uma modificação deste sistema é descrita na Pat. No. 4.601.978. Vide também Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982), descrevendo a expressão do cDNA do interferon β humano em células de camundongo sob o controle de um promotor da timidina-quinase do vírus do herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do vírus Rous Sarcoma pode ser usada como promotor.

e) Componente do elemento aprimorador

[00208] A transcrição de DNA que codifica um anticorpo da presente divulgação por eucariotos superiores é frequentemente aumentada pela inserção de uma sequência intensificadora no vetor. Muitas sequências intensificadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, no entanto, será usado um intensificador de um vírus de células eucarióticas. Os exemplos incluem o intensificador de SV40 no lado tardio da origem da replicação (pb 100-270), o intensificador de promotor precoce de citomegalovírus humano, o intensificador de promotor precoce de citomegalovírus de camundongo, o intensificador de polioma no lado tardio da origem de replicação e intensificadores de adenovírus. Ver também Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) descrevendo elementos potenciadores para a ativação de promotores eucarióticos. O intensificador pode ser emendado no vetor na posição 5' ou 3' para a sequência que codifica o polipeptídeo de anticorpo, mas geralmente está localizado no local 5' do promotor.

f) Componente de Término de Transcrição

[00209] Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas também podem conter sequências necessárias para a

terminação da transcrição e para estabilização do mRNA. Tais sequências estão geralmente disponíveis a partir das regiões 5' e, ocasionalmente 3', não traduzidas de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA que codifica um anticorpo. Um componente útil de terminação da transcrição é a região de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino. Ver WO94/11026 e o vetor de expressão aqui divulgado.

g) Seleção e Transformação de Células Hospedeiras

[00210] As células hospedeiras adequadas para clonar ou expressar o DNA nos vetores aqui incluem as células eucarióticas superiores aqui descritas, incluindo células hospedeiras de vertebrados. A propagação de células vertebradas em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens celulares hospedeiras de mamífero úteis são a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspens, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renais de filhote de hamster (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovário de hamster chinês / -DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (vivoO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renais caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; Células FS4; Células CHOK1, células

CHOK1SV ou derivados e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

[00211] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem acima descritos para produção de anticorpos e cultivadas em meios nutricionais convencionais modificados conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

h) Cultivo das Células Hospedeiras

[00212] As células hospedeiras usadas para produzir um anticorpo da presente divulgação podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis, como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Modul Eagle's Medium (DMEM), da Dulbecco (DMEM), Sigma) são adequados para cultivar as células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Pat. No. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Pat. Re. 30.985 pode ser usado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um desses meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (como insulina, transferrina ou fator de crescimento epidérmico), sais (como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (como HEPES), nucleotídeos (como adenosina e timidina), antibióticos (como o medicamento GENTAMYCIN TM), oligoelementos (definidos como compostos inorgânicos geralmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos também podem ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidas dos especialistas na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são aquelas usadas anteriormente com a célula hospedeira sele-

cionada para expressão e serão evidentes para o especialista na técnica.

i) Purificação de Anticorpo

[00213] Ao usar técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, ou diretamente secretado no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, células hospedeiras ou fragmentos lisados, podem ser removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Quando o anticorpo é secretado no meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão podem ser primeiro concentrados usando um filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease como o PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para impedir o crescimento de contaminantes adventícios.

[00214] A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade uma técnica conveniente. A adequação da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e isótipo de qualquer domínio Fc da imunoglobulina que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que são baseados nas cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isótipos de camundongo e para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade está ligado pode ser agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, como vidro de poro controlado ou poli (estireno-divinil) benzeno, permitem taxas de fluxo mais

rápidas e tempos de processamento mais curtos do que os obtidos com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteínas, como fracionamento em uma coluna de troca iônica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em cromatografia em heparina SEPHAROSE™ em uma resina de troca aniônica ou catiônica (como uma coluna de ácido poliaspártico), focagem cromatofílica, A precipitação com SDS-PAGE e sulfato de amônio também está disponível, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

[00215] Após qualquer etapa preliminar da purificação, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e os contaminantes pode ser submetida à purificação adicional, por exemplo, por cromatografia de interação hidrofóbica de baixo pH usando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, realizada em baixas concentrações de sal (por exemplo, de cerca de 0-0,25 M de sal).

[00216] Em geral, várias metodologias para a preparação de anticorpos para uso em pesquisa, teste e uso clínico são bem estabelecidas na técnica, consistentes com as metodologias descritas acima e/ou consideradas apropriadas por um especialista na técnica para um anticorpo específico de interesse.

Produção de Anticorpos não Fucosilados

[00217] São aqui fornecidos métodos para preparar anticorpos com um grau reduzido de fucosilação. Por exemplo, os métodos aqui contemplados incluem, entre outros, o uso de linhagens celulares deficientes na fucosilação de proteínas (por exemplo, células CHO Lec13, células CHO nocauteadas no gene da alfa-1,6-fucosiltransferase, células que superexpressam β 1,4-N-acetilglicosaminiltransferase III e superexpressão de μ -manosidase II de Golgi, etc.) e adição de um análogo (s) de fucose em um meio de cultura celular usado para a produção dos

anticorpos. Vide Ripka et al. *Arco. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); Pedido de Patente US No. US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 2004/056312 A1; Yamane-Ohnuki et al. *Biotecnologia. Bioeng.* 87: 614 (2004); e Pat. 8.574.907. Técnicas adicionais para reduzir o conteúdo de fucose de anticorpos incluem a tecnologia Glymaxx descrita na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2012/0214975. Técnicas adicionais para reduzir o conteúdo de fucose dos anticorpos também incluem a adição de um ou mais inibidores da glicosidase em um meio de cultura de células usado para a produção dos anticorpos. Os inibidores de glicosidase incluem α -glucosidase I, α -glucosidase II e α -manosidase I. Em algumas modalidades, o inibidor de glicosidase é um inibidor da α -manosidase I (por exemplo, kifunensina).

[00218] Como aqui utilizado, "fucosilação do núcleo" refere-se à adição de fucose ("fucosilação") à N-acetilglucosamina ("GlcNAc") no terminal redutor de um glicano ligado a N. Também são fornecidos anticorpos produzidos por esses métodos e composições dos mesmos.

[00219] Em algumas modalidades, a fucosilação de cadeias de açúcar complexas ligadas a N-glicosídeo ligadas à região Fc (ou domínio) é reduzida. Como aqui utilizado, uma "cadeia de açúcar ligada a N-glicosídeo complexo" é tipicamente ligada à asparagina 297 (de acordo com o número de Kabat), embora uma cadeia de açúcar complexa ligada a N-glicosídeo também possa ser ligada a outros resíduos de asparagina. Uma "cadeia de açúcar complexa ligada a N-glicosídeo" exclui um tipo de cadeia de açúcar com alto teor de manose, em que apenas a manose é incorporada no N-terminal redutor da estrutura do núcleo, mas inclui 1) um tipo complexo, no qual o lado terminal não redutor da estrutura do núcleo tem uma ou mais ramificações da galactose-N-acetilglucosamina (também conhecida como "gal-GlcNAc") e o lado terminal não redutor do Gal-GlcNAc opcionalmente tem um ácido siálico, bissetilando a N-acetilglucosamina ou similar; ou

2) um tipo híbrido, no qual o lado terminal não redutor da estrutura do núcleo tem ambas as ramificações da cadeia de açúcar ligada a N com glicosídeo com manose elevada e a cadeia de açúcar complexa ligada a N com glicosídeo.

[00220] Em algumas modalidades, a "cadeia complexa de açúcar ligada a N-glicosídeo" inclui um tipo complexo no qual o lado terminal não redutor da estrutura do núcleo tem zero, uma ou mais ramificações de galactose-N-acetilglucosamina (também referida como "gal-GlcNAc") e o lado terminal não redutor de Gal-GlcNAc opcionalmente ainda tem uma estrutura como um ácido siálico, bissetorial de N-acetilglucosamina ou similar.

[00221] De acordo com os métodos presentes, tipicamente apenas uma quantidade menor de fucose é incorporada na cadeia (s) de açúcar complexa ligada a N-glicosídeo. Por exemplo, em várias modalidades, menos de cerca de 60%, menos de cerca de 50%, menos de cerca de 40%, menos de cerca de 30%, menos de cerca de 20%, menos de cerca de 15%, menos de cerca de 10%, menos que cerca de 5%, ou menos que cerca de 1% do anticorpo tem fucosilação do núcleo por fucose em uma composição. Em algumas modalidades, substancialmente nenhum (ou seja, menos de cerca de 0,5%) do anticorpo tem fucosilação do núcleo por fucose em uma composição. Em algumas modalidades, mais de cerca de 40%, mais de cerca de 50%, mais de cerca de 60%, mais de cerca de 70%, mais de cerca de 80%, mais de cerca de 90%, mais de cerca de 91%, mais de cerca de 92%, mais do que 93%, mais do que cerca de 94%, mais do que cerca de 95%, mais do que cerca de 96%, mais do que cerca de 97%, mais do que cerca de 98% ou mais do que cerca de 99% do anticorpo é não fucosilado em uma composição.

[00222] Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo em que substancialmente (ou seja, menos de 0,5%) das cadeias de

carboidratos ligadas a N-glicosídeo contêm um resíduo de fucose. Em algumas modalidades, é aqui fornecido um anticorpo em que pelo menos uma ou duas das cadeias pesadas do anticorpo são não fucosiladas.

[00223] Como descrito acima, uma variedade de sistemas de vetores de expressão de hospedeiro em mamíferos pode ser utilizada para expressar um anticorpo. Em algumas modalidades, o meio de cultura não é suplementado com fucose. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um análogo de fucose é adicionada ao meio de cultura. Nesse contexto, uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade do análogo que é suficiente para diminuir a incorporação de fucose em uma cadeia complexa de açúcar ligada a N-glicosídeo de um anticorpo em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, em pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50%. Em algumas modalidades, os anticorpos produzidos pelos métodos instantâneos compreendem adquirir pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50% de proteína fucosilada não nuclear (por exemplo, falta de fucosilação nuclear), em comparação com os anticorpos produzidos a partir das células hospedeiras cultivadas na ausência de um análogo da fucose.

[00224] O conteúdo (por exemplo, a proporção) de cadeias de açúcar nas quais a fucose não está ligada à N-acetilglucosamina na extremidade redutora da cadeia de açúcar versus cadeias de açúcar nas quais a fucose está ligada à N-acetilglucosamina na extremidade redutora da cadeia de açúcar pode ser determinada, por exemplo, como descrito nos Exemplos. Outros métodos incluem hidrazinólise ou digestão enzimática (vide, por exemplo, Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi (1989)), rotu-

lagem de fluorescência ou radioisótopo da cadeia de açúcar liberada e depois separação da cadeia de açúcar marcada por cromatografia. Além disso, as composições das cadeias de açúcar liberadas podem ser determinadas através da análise das cadeias pelo método HPAEC-PAD (vide, por exemplo, J. Liq Chromatogr. 6:1557 (1983)). (vide geralmente a Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2004/0110282.).

III Composições

[00225] Em alguns aspectos, também são fornecidas aqui composições (por exemplo, composições farmacêuticas) compreendendo qualquer um dos anticorpos anti-Siglec-8 aqui descritos (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8). Em alguns aspectos, é aqui fornecida uma composição compreendendo um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito, em que o anticorpo compreende uma região Fc e cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo ligadas à região Fc, em que menos de cerca de 50% da N cadeias de carboidratos ligadas a glicosídeos contêm um resíduo de fucose. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região Fc e cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo ligadas à região Fc, em que menos de cerca de 45%, cerca de 40%, cerca de 35%, cerca de 30%, cerca de 25%, cerca de 20%, ou cerca de 15% das cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo contêm um resíduo de fucose. Em alguns aspectos, é aqui fornecida uma composição compreendendo um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito, em que o anticorpo compreende uma região Fc e cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo ligadas à região Fc, em que substancialmente nenhuma das cadeias de carboidratos ligadas a N-glicosídeo contêm um resíduo de fucose.

[00226] As formulações terapêuticas são preparadas para armazenamento misturando o ingrediente ativo com o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis opcionais (Remington: The Science e Practice of Pharmacy,

20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Filadélfia, Pa. 2000). Portadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas doses e concentrações empregadas e incluem tampões, antioxidantes, incluindo ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabissulfito de sódio; conservantes, isotonicificadores, estabilizadores, complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteína Zn); agentes quelantes como EDTA e/ou surfactantes não iônicos.

[00227] Os tampões podem ser usados para controlar o pH em uma faixa que otimiza a eficácia terapêutica, especialmente se a estabilidade depende do pH. Os tampões podem estar presentes em concentrações que variam de cerca de 50 mM a cerca de 250 mM. Agentes tamponantes adequados para uso com a presente divulgação incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e seus sais. Por exemplo, citrato, fosfato, succinato, tartarato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Além disso, os tampões podem ser constituídos por sais de histidina e trimetilamina, como Tris.

[00228] Conservantes podem ser adicionados para impedir o crescimento microbiano e estão tipicamente presentes em uma faixa de cerca de 0,2% a 1,0% (p/v). Conservantes adequados para uso com a presente divulgação incluem cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; halogenetos de benzalcônio (por exemplo, cloreto, brometo, iodeto), cloreto de benzetônio; álcool timerosal, fenol, butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol.

[00229] Agentes de tonicidade, às vezes conhecidos como "estabilizadores", podem estar presentes para ajustar ou manter a tonicidade do líquido em uma composição. Quando usados com biomoléculas grandes e carregadas, como proteínas e anticorpos, são frequentemente denominados "estabilizadores" porque podem interagir com os

grupos carregados das cadeias laterais de aminoácidos, diminuindo assim o potencial de interações inter e intramoleculares. Os agentes de tonicidade podem estar presentes em qualquer quantidade entre cerca de 0,1% a cerca de 25% em peso ou entre cerca de 1 a cerca de 5% em peso, levando em consideração as quantidades relativas dos outros ingredientes. Em algumas modalidades, agentes de tonicidade incluem álcoois de açúcar poli-hídricos, álcoois tri-hídricos ou superiores, como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol.

[00230] Excipientes adicionais incluem agentes que podem servir como um ou mais dos seguintes: (1) agentes de volume, (2) intensificadores de solubilidade, (3) estabilizadores e (4) e agentes que impedem a desnaturação ou aderência à parede do recipiente. Tais excipientes incluem: álcoois de açúcar poli-hídrico (enumerados acima); aminoácidos tais como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc.; açúcares orgânicos ou álcoois de açúcar, tais como sacarose, lactose, lactitol, trealose, estaquiase, manose, sorbose, xilose, ribose, ribitol, mioinositose, mioinisol, galactose, galactitol, glicerol, ciclitóis (por exemplo, inositol), polietileno glicol; agentes redutores contendo enxofre, tais como uréia, glutathione, ácido tiotico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, α -monotioglicol e tio sulfato de sódio; proteínas de baixo peso molecular, tais como albumina sérica humana, albumina sérica bovina, gelatina ou outras imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos (por exemplo, xilose, manose, frutose, glicose); dissacarídeos (por exemplo, lactose, maltose, sacarose); trissacarídeos como rafinose; e polissacarídeos tais como dextrina ou dextrano.

[00231] Surfactantes ou detergentes não iônicos (também conhecidos como "agentes molhantes") podem estar presentes para ajudar a solubilizar o agente terapêutico, bem como para proteger a proteína

terapêutica contra a agregação induzida por agitação, o que também permite que a formulação seja exposta a tensão superficial de cisalhamento sem causar desnaturação da proteína ou anticorpo terapêutico ativo. Os surfactantes não iônicos estão presentes em uma faixa de cerca de 0,05 mg/ml a cerca de 1,0 mg/ml ou cerca de 0,07 mg/ml a cerca de 0,2 mg/ml. Em algumas modalidades, surfactantes não iônicos estão presentes em uma faixa de cerca de 0,001% a cerca de 0,1% em peso / v ou cerca de 0,01% a cerca de 0,1% em peso / v ou cerca de 0,01% a cerca de 0,025% em peso / v.

[00232] Os surfactantes não iônicos adequados incluem polissorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxâmeros (184, 188, etc.), polióis PLURONIC®, TRITON®, monoéteres de polietileno sorbitano (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.), lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, óleo de rícino hidrogenado com polioxietileno 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graxo de sacarose, metil celulose e carboximetil celulose. Detergentes aniônicos que podem ser utilizados incluem lauril sulfato de sódio, sulfato de sódio dioctil de sódio e sulfonato de dioctil de sódio. Detergentes catiônicos incluem cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio.

[00233] Para que as formulações sejam usadas para administração *in vivo*, elas devem ser estéreis. A formulação pode ser tornada estéril por filtração através de membranas de filtração estéreis. As composições terapêuticas aqui apresentadas são geralmente colocadas em um recipiente com uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00234] A via de administração está de acordo com métodos conhecidos e aceitos, como por bolus único ou múltiplo ou infusão por um longo período de tempo de maneira adequada, por exemplo, injeção ou infusão por via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intra-

muscular, vias intra-arterial, intralesional ou intra-articular, administração tópica, inalação ou por meios de liberação prolongada ou de liberação prolongada.

[00235] A formulação deste documento também pode conter mais de um composto ativo conforme necessário para a indicação específica a ser tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não se afetam adversamente. Tais compostos ativos estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

IV Artigos de Fabricação ou Kits

[00236] Em outro aspecto, é fornecido um artigo de fabricação ou kit que compreende um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano). O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender instruções para o uso do anticorpo nos métodos da presente divulgação. Assim, em certas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende instruções para o uso de um anticorpo anti-Siglec-8 que se liga ao Siglec-8 humano em métodos para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, queratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-Siglec-8 que se liga ao Siglec-8 humano. Em certas modalidades, o artigo de fabricação compreende um medicamento que compreende um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano e uma bula que compreende instruções para administração do medicamento em um indivíduo que dele necessite para tratar e/ou prevenir uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, queratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Em algumas modalidades, a bula indica ainda que o tratamento é eficaz na redução de um ou mais sintomas no indivíduo com uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, cerato-

conjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em comparação com o nível basal antes da administração do medicamento. Em algumas modalidades, o indivíduo é diagnosticado com uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) antes da administração do medicamento que compreende o anticorpo. Em certas modalidades, o indivíduo é um humano.

[00237] O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender um recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos (por exemplo, frascos de câmara dupla), seringas (como seringas de câmara única ou dupla) e tubos de ensaio. O recipiente pode ser formado a partir de uma variedade de materiais, como vidro ou plástico. O recipiente contém a formulação.

[00238] O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender um rótulo ou um folheto informativo, que está no ou associado ao recipiente, pode indicar instruções para a reconstituição e/ou uso da formulação. O rótulo ou a bula pode indicar ainda que a formulação é útil ou destinada a administração subcutânea, intravenosa ou outros modos de tratamento e/ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo. O recipiente que contém a formulação pode ser um frasco de uso único ou um frasco de uso múltiplo, o que permite administrações repetidas da formulação reconstituída. O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um diluente adequado. O artigo de fabricação ou kit pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial, terapêutico e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso.

[00239] Em uma modalidade específica, a presente divulgação fornece kits para uma unidade de administração de dose única. Esses kits compreendem um recipiente de uma formulação aquosa de anti-

corpo terapêutico, incluindo seringas pré-cheias de uma ou várias câmaras. Seringas pré-cheias exemplares estão disponíveis na Vetter GmbH, Ravensburg, Alemanha.

[00240] Em outra modalidade, é aqui fornecido um artigo de fabricação ou kit compreendendo as formulações aqui descritas para administração em um dispositivo autoinjeter. Um injetor automático pode ser descrito como um dispositivo de injeção que, após a ativação, fornecerá seu conteúdo sem a ação necessária adicional do paciente ou administrador. Eles são particularmente adequados para automedicação de formulações terapêuticas quando a taxa de entrega deve ser constante e o tempo de entrega é superior a alguns momentos.

[00241] Em outro aspecto, é fornecido um artigo de fabricação ou kit que compreende um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano). O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender instruções para o uso do anticorpo nos métodos da presente divulgação. Assim, em certas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende instruções para o uso de um anticorpo anti-Siglec-8 que se liga ao Siglec-8 humano em métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, queratoconjuntivite, ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-Siglec-8 que se liga ao Siglec-8 humano. Em certas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende um medicamento que compreende um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano e uma bula que compreende instruções para administração do medicamento em um indivíduo que dele necessite para tratar e/ou prevenir uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante).

[00242] A presente divulgação também fornece um artigo de fabri-

cação ou kit que compreende um anticorpo anti-Siglec-8 aqui descrito (por exemplo, um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano) em combinação com um ou mais medicamento adicional (por exemplo, um segundo medicamento) para tratar ou prevenir uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo. O artigo de fabricação ou kit pode ainda compreender instruções para o uso do anticorpo em combinação com um ou mais medicamento adicional nos métodos da presente divulgação. Por exemplo, o artigo de fabricação ou kit aqui opcionalmente compreende ainda um recipiente compreendendo um segundo medicamento, em que o anticorpo anti-Siglec-8 é um primeiro medicamento e esse artigo ou kit compreende ainda instruções no rótulo ou na bula para tratar o indivíduo com o segundo medicamento, em quantidade eficaz. Assim, em certas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende instruções para o uso de um anticorpo anti-Siglec-8 que se liga ao Siglec-8 humano em combinação com um ou mais medicamento adicional em métodos para tratar ou prevenir uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante) em um indivíduo. Em certas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende um medicamento que compreende um anticorpo que se liga ao Siglec-8 humano (por exemplo, um primeiro medicamento), um ou mais medicamento adicional e um folheto informativo compreendendo instruções para administração do primeiro medicamento em combinação com o um ou mais medicamento adicional (por exemplo, um segundo medicamento). Em algumas modalidades, o um ou mais agentes terapêuticos adicionais podem incluir, mas não estão limitados a, um corticosteroide (por exemplo, budesonida, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona ou predisona), anti-histamínico (por exemplo, cloridrato de levocabastina ou olopatadina), cetotifeno, azelastina, epinastina,

bepostatina, ciclosporina e um agente anti-inflamatório não esteroide (NSAID).

[00243] Entende-se que os aspectos e modalidades descritos neste documento são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações à sua luz serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e serão incluídas no espírito e alcance deste aplicativo e âmbito das reivindicações anexas.

EXEMPLOS

[00244] A presente divulgação será mais completamente compreendida por referência aos seguintes exemplos. Os exemplos não devem, no entanto, ser interpretados como limitativos do escopo da presente divulgação. Entende-se que os exemplos e modalidades descritos neste documento são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações à luz serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e deverão ser incluídas dentro do espírito e alcance deste aplicativo e escopo das reivindicações anexadas.

Exemplo 1: Avaliação de anticorpos anti-Siglec-8 em modelos de camundongos *in vivo* de conjuntivite alérgica

[00245] Modelos animais foram estabelecidos para o estudo de várias doenças oculares alérgicas (vide, por exemplo, Groneberg, DA et al. (2003) Allergy 58: 1101-1113), incluindo um modelo de camundongo para conjuntivite alérgica (Giavina-Bianchi, P. et al. (2008) Acta Ophthalmol. 86: 670-675). Para a avaliação do efeito dos anticorpos anti-Siglec-8 em modelos murinos de conjuntivite alérgica, os camundongos transgênicos Siglec-8 são sensibilizados pela administração sistêmica do alérgeno e, em seguida, submetidos ao desafio ocular do alérgeno, seguido pela avaliação clínica da conjuntivite, no intervalo de tempo entre 15 min e 24 horas após o desafio para observar respostas inflamatórias nas fases inicial e tardia.

[00246] Um modelo "Der p" para camundongos C57Bl/6 descrito

por Giavina-Bianchi, P. et al. (2008) *Acta Ophthalmol.* 86: 670-675 é conduzida da seguinte maneira. Os camundongos são imunizados com soluções preparadas a partir de extratos de *D. pteronyssinus* ("Der p") no dia 0. Após 10 dias, é realizado o desafio ocular para induzir a conjuntivite alérgica.

[00247] A análise clínica e a coleta de material para análises laboratoriais são realizadas 20 minutos e até 24 horas após o desafio ocular. Especificamente, os camundongos recebem uma solução de imunização contendo 5 a 500 microgramas de alérgeno por via subcutânea na base de ambas as pernas traseiras e no abdome inferior.

[00248] Um quarto da dose é injetado em cada perna traseira e a metade restante é injetada no abdômen. Dez dias após a sensibilização, os camundongos são desafiados com duas gotas de solução de alérgeno (4-5 microgramas / microlitro) em cada olho. Em intervalos entre 20 minutos e 24 horas após o desafio, os camundongos são examinados quanto a edema conjuntival; edema palpebral; hiperemia conjuntival e lacrimejamento. Os tecidos e secreções são analisados quanto a citocinas e presença de células inflamatórias, incluindo mastócitos e eosinófilos. Para a avaliação da atividade do anticorpo anti-Siglec-8, o anticorpo ou um anticorpo de controle de isótipo é administrado em um nível de dose de 0,1 - 5,0 mg/kg por administração intraperitoneal (ip) 1 dia ou 3 dias antes do desafio ocular ou uso administração duas vezes por semana a partir do momento da sensibilização.

[00249] Para conjuntivite induzida por ovalbumina, camundongos transgênicos Siglec-8 são sensibilizados pela administração ip de 0,1 mg de ovalbumina com 1 mg de adjuvante de hidróxido de alumínio e 0,3 mg de toxina pertussis, reforçada no dia 4 com 50 microgramas de ovalbumina administrada por via subcutânea (sc), e desafiado pelo desafio ocular com 0,75 mg de ovalbumina no dia 17, de acordo com o método descrito por Izushi, K. et al. (2002) *Eur. J. Pharmacol.* 440: 79-

82. Tratamentos de anticorpo anti-Siglec-8, análises clínicas e análises laboratoriais são conduzidas como descrito acima.

[00250] Para conjuntivite induzida por ambrósia, camundongos transgênicos Siglec-8 são sensibilizados pela administração sc de 50 microgramas de extrato de ambrósia e 5 mg de hidróxido de alumínio no dia 0, e o desafio ocular é conduzido com 1,25 mg de extrato de ambrósia no dia 9, conforme descrito por Magone, MT et al. (1998) Clin. Immunol. Immunopathol. 87 (1): 75-84. Tratamentos de anticorpo anti-Siglec-8, análises clínicas e análises laboratoriais são conduzidas como descrito acima.

Exemplo 2: Estrutura de um estudo piloto aberto para avaliar a eficácia e segurança de anticorpos anti-Siglec-8 em pacientes com ceratoconjuntivite atópica (AKC), ceratoconjuntivite vernal (VKC) e conjuntivite alérgica perene (PAC)

[00251] O número de pessoas atingidas por doenças oculares alérgicas aumentou nas últimas décadas e acredita-se que agora afete pelo menos 15-20% da população (La Rosa, M. et al. (2013) *Ital. J. Pediatr* 39:18). As doenças oculares alérgicas abrangem várias entidades clínicas específicas com diferentes mecanismos de ação. Este estudo foi desenvolvido para testar a segurança e a eficácia do tratamento com anticorpos anti-Siglec-8 em pacientes com AKC, VKC ou PAC.

[00252] Um total de aproximadamente 30 indivíduos recebe 6 doses de anticorpo anti-Siglec-8 HEKA (IgG1 não fucosilado) com até 3 mg/kg como infusão intravenosa mensal. Os parâmetros clínicos laboratoriais e os eventos adversos são avaliados usando os Critérios de Terminologia Comuns para Eventos Adversos (CTCAE) versão 4.03. Os eventos adversos são coletados a partir do momento da primeira infusão do medicamento em estudo e terminando no dia 309 ($\pm$ 7 dias) ou na visita de término precoce (ET). As contagens absolutas de san-

que periférico de eosinófilos e basófilos são medidas a partir da pré-dose no dia -1 e terminando no dia 309 ou na visita da ET. Um questionário de sintomas de conjuntivite alérgica (ACS) é usado para avaliar os sintomas associados ao AKC, VKC ou PAC, e é preenchido por cada indivíduo diariamente ao longo do estudo, desde a triagem até o dia 309 ou a visita do ET.

[00253] Critérios de inclusão incluem:

(a) idade (≥ 18 e ≤ 80 anos);

(b) diagnóstico confirmado de AKC, VKC ou PAC e, para pelo menos um dos sintomas abaixo, uma pontuação média de sintomas ≥ 3 calculada de todos os questionários diários da SCA preenchidos durante o período de triagem (deve ser necessário no mínimo 14 questionários diários da SCA concluída):

1. Prurido
2. Fotofobia
3. Dor nos olhos
4. Sensação de corpo estranho
5. Secreção ocular

(c) histórico de uso tópico de corticosteroide e/ou corticosteroide sistêmico no tratamento de conjuntivite alérgica (AKC, VKC ou PAC);

(d) dose (s) estável de medicamentos permitidos para AKC, VKC ou PAC durante os 14 dias anteriores à triagem e durante todo o período de triagem; e compromisso de permanecer na (s) mesma (s) dose (s) de medicamento (s) AKC, VKC ou PAC durante toda a duração da participação no estudo (a menos que a modificação da dose seja devida a necessidade médica imprevista);

(e) teste de rastreamento de óvulos e parasitas negativo; e

(f) teste de gravidez negativo (mulheres).

[00254] Os critérios de exclusão incluem:

(a) histórico de malignidade, exceto carcinoma in situ no colo do útero, câncer de próstata em estágio inicial ou câncer de pele não melanoma;

(b) uso de lentes de contato dentro de 48 horas antes da primeira dose do anticorpo;

(c) participação em um estudo intervencionista simultâneo com a última intervenção ocorrendo dentro de 30 dias antes da administração do medicamento do estudo (ou 90 dias ou 5 meias-vidas, o que for maior, para produtos biológicos);

(d) tratamento com quimioterapia ou radioterapia nos 6 meses anteriores;

(e) tratamento de uma infecção parasitária helmíntica clinicamente significativa dentro de 6 meses após a triagem;

(f) uso durante os 30 dias antes da Triagem (ou 5 meias-vidas, o que for maior) ou durante o período de Triagem de descongestionantes tópicos, vasoconstritores tópicos, inibidores tópicos da calcineurina, corticosteroides tópicos, omalizumabe, dupilumabe, imunossuppressores sistêmicos ou corticosteroides sistêmicos com uma dose diária > 10 mg de prednisona ou equivalente (corticosteroides tópicos para dermatite atópica, sprays nasais com corticosteroides para rinite e corticosteroides inalados para asma alérgica são permitidos);

(g) vacinação com vacinas vivas atenuadas dentro de 30 dias antes do início do tratamento no estudo, durante o período de tratamento ou vacinação esperada dentro de 5 semividas (4 meses) da administração do medicamento em estudo;

(h) resultados sorológicos positivos para hepatite, exceto para pacientes vacinados ou com hepatite passada, mas resolvida, na Triagem; e

(i) resultados sorológicos positivos para HIV na Triagem.

[00255] O desfecho primário é a segurança e a tolerabilidade do tratamento com anticorpos, com base na avaliação de parâmetros clínicos de laboratório e eventos adversos, avaliados pelo Critério de terminologia comum para eventos adversos (CTCAE) versão 4.03.

[00256] As medidas de resultados secundários incluem:

(a) alterações desde a linha de base nas contagens absolutas de sangue periférico de eosinófilos e basófilos (iniciando a pré-dose no dia 1 ao dia 309 ou na visita da ET); e

(b) alterações dos sintomas basais associados ao AKC, VKC ou PAC, medidos diariamente por um questionário de paciente específico da doença, o Questionário de Sintomas de Conjuntivite Alérgica (ACS) (durante todo o estudo, desde a triagem até o dia 309 ou a visita do ET).

[00257] Medidas de resultados secundários opcionais incluem:

(a) alterações da qualidade de vida basal, medida pelo Questionário de Funcionalidade Visual do National Eye Institute - 25 (NEI VFQ 25) (iniciando a pré-dose no dia 1 ao dia 309 ou na visita do ET);

(b) alterações dos sinais oculares da linha de base (incluindo coloração pontual da córnea) em fotografia colorida por lâmpada de fenda (biomicroscópio ocular) como avaliadas pelo centro de leitura de imagens centralizadas (iniciando a pré-dose no dia -1 ao dia 309 ou na visita do ET);

(c) alterações das pontuações oculares dos sintomas oculares do exame oftalmológico, avaliadas pelo Investigador ou pelo Subinvestigador (iniciando a pré-dose no dia 1 ao dia 309 ou na visita do ET);

(d) alterações dos mediadores inflamatórios basais e da concentração de anticorpos anti-Siglec-8 HEKA (IgG1 não fucosilada), medidos em amostras opcionais de líquido lacrimal (lágrima) (iniciando

a pré-dose no dia 1 ao dia 309 ou na visita da ET);

(e) alterações do exame histopatológico basal de eosinófilos e mastócitos em biópsias conjuntivais opcionais (coletadas no dia 1 pré-dose e no dia 169 ou na visita ET);

(f) alterações dos sinais e sintomas basais, conforme medido pelas pontuações diárias dos sintomas do questionário específico da doença da ACS para 5 sintomas diferentes (durante todo o estudo, desde a triagem até o dia 309 ou a visita do ET);

(g) alterações dos sinais e sintomas basais, conforme medida pelo questionário de Qualidade de Vida, o Questionário de Função Visual do National Eye Institute 25 (NEI VFQ 25); e

(h) alterações dos sinais e sintomas basais, medidos pela avaliação de condições atópicas concomitantes (dermatite atópica, asma alérgica, rinite alérgica).

SEQUÊNCIAS

[00258] Todas as sequências polipeptídicas são apresentadas do N-terminal ao C-terminal, a menos que indicado de outra forma.

[00259] Todas as sequências de ácidos nucleicos são apresentadas 5' a 3', a menos que indicado de outra forma.

Sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada 2E2 de camundongo

QVQLKESGPGGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEW
LGVIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYC
ARDGSSPYYYSM EYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 1)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2 RHA

EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFS LTIYGAHWVRQAPGKGLE
WVSVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGSSPYYYSM EYWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 2)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHB

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WLGVIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WWSVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WLSVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WWSVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 7)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
 WWSVIWAGGSTNYNSALMSRFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2 RHA2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYGAHWIRQPPGKGLEW
IGVIWAGGSTNYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
ARDGSSPYYYSM EYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2 RHB2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLE
WLGVIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVY
YCARDGSSPYYYSM EYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada de 2E2 RHE S-G

EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGSSPYYYGMEYWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 11)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2 RHE E-D

EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGSSPYYYSM DYWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 12)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 2E2 RHE Y-V

EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGSSPYYYSM EVWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 13)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada de 2E2 RHE mutante triplo

EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLE
WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGSSPYYYGMDVWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 14)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 de camundongo

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIY
STSNLASGVVPVRFSGSGSGTSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ
RSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 15)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLI
YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPF
TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 16)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKB

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIY
STSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPF
TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 17)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2

RKC

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIY
STSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFT
FGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 18)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2

RKD

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWI
YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPF
TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 19)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKE

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLI
YSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYP
FTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 20)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLI
YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPF

TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 21)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2
RKG

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWYQQKPGQAPRLLI
 YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPF

TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 22)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKA
F-Y

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLI
 YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPY

TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 23)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 2E2 RKF
F-Y

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLI
 YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPY

TFGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 24)

Sequência de aminoácido da cadeia pesada HEKA e da cadeia
pesada HEKF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLE
 WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYYSM EYWGGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75)

Sequência de aminoácido da cadeia leve HEKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLI

YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPF
TFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 76)

Sequência de aminoácido da cadeia leve HEKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWYFQKPKGQAPRLLI
YSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSTLEPEDFAVYYCQQRSSYPF
TFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 77)

Sequência de aminoácido da região constante de cadeia pesada de IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLT
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG (SEQ ID NO: 78)

Sequência de aminoácido da região constante de cadeia pesada de IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
(SEQ ID NO: 79)

Sequência de aminoácido da região constante de cadeia leve Ig kappa
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRFAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 80)

Sequência de aminoácido da cadeia pesada 2C4 e 2E2 IgG1 de murino

QVQLKRRASGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLE
 WLGVIVAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDITALY
 YCARDGSSPYYSMEYWGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQT
 NSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLESPLYTLSS
 SVTVPSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPE
 VSSVFIFPPKPKDVLITLTTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEV
 HTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAFAFA
 PIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV
 EWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVYSKLVNQQKSINWEAGNTFT
 CSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG (SEQ ID NO: 81)

Sequência de aminoácido da cadeia leve k2pa murina 2C4

EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLVYI
 STSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPF
 TFGSGTKLEIKADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN
 VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTITKDEYERHNSY
 TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 82)

Sequência de aminoácido da cadeia leve 2E2 kappa murina

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLVYI
 STSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPF
 TFGSGTKLEIKADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN
 VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTITKDEYERHNSY
 TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 83)

Sequência de aminoácido da cadeia pesada quimérica 2C4 e 2E2 IgG1

QVQLKRRASGPGGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLE
 WLGVWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSQTDDTALY
 YCARDGSSPYYSMEYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 84)

Sequência de aminoácido da cadeia leve quimérica 2C4 kappa

EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLWIY
 STSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPF
 TFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)

Sequência de aminoácido de 2E2 quimérico Cadeia leve kappa

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLWIY
 STSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPF
 TFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

Sequência de aminoácido da cadeia pesada HEKA IgG4 (IgG4 contém uma mutação S228P)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLE
 WVGVIWAGGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARDGSSPYYSMEYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
 SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPA
 PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 87)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada 1C3 de camundongo (resíduos sublinhados compreendem CDRs H1 e H2 de acordo com a numeração de Chothia)

EVQVVESGGDLVKSGGSLKLSCAASGFPFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVAIISSGGSYTYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSSLKSEDTAMYYCARHETAQAAWFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:106)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada de 1H10 de camundongo (resíduos sublinhados compreendem CDRs H1 e H2 de acordo com a numeração de Chothia)

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIDYIMYYWVKQRPEQGLEWIGRIAPEDGDTEYAPKFQKGKATVTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:107)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia pesada de 4F11 de camundongo (resíduos sublinhados compreendem CDRs H1 e H2 de acordo com a numeração de Chothia)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFRSSWMNWKQRPGKGLEWIGQIYPGDDYTNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYFCARLGPYPGFADWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:108)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve 1C3 de camundongo

QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAYGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 109)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve de 1H10 de camundongo

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLI

YFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 110)

Sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve de 4F11
de camundongo

QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLLI
YDTSSLASGVPPVRFSGSGSGTSGTSGTSYSLTISRIESEDAAANYCQ
QWNSDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 111)

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar ou prevenir uma doença ocular alérgica em um indivíduo caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um anticorpo que se liga a Siglec-8 humana.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem conjuntivite alérgica.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem conjuntivite alérgica sazonal.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem conjuntivite alérgica perene.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem ceratoconjuntivite atópica.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem ceratoconjuntivite vernal.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem conjuntivite papilar gigante.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o indivíduo usa lentes de contato.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem inflamação aumentada em pelo menos uma porção da conjuntiva, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem um número aumentado de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, e/ou linfócitos em pelo menos uma porção da conjuntiva, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que um esfregaço da conjunti-

val obtido do indivíduo compreende eosinófilos.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que uma amostra de soro ou lágrima obtida do indivíduo tem um aumento de IgE, em comparação com um indivíduo sem uma doença ocular alérgica.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que um teste de alergia epicutâneo ou intracutâneo administrado ao indivíduo que utiliza o alérgeno resulta em uma resposta alérgica.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que um ou mais sintoma (s) no indivíduo são reduzidos em comparação com um nível de linha de base antes da administração da composição.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que um ou mais de prurido conjuntival, vermelhidão conjuntival, edema na conjuntiva, secreção ocular, ulcerações, lacrimejamento, hipertrofia da pálpebra, prurido, simbléfaro, eczema periocular, madarose, fotofobia, ceratite, papilar gigante, e cataratas no indivíduo são reduzidos em comparação com um nível de linha de base antes da administração da composição.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por infusão intravenosa.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por injeção subcutânea.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região Fc e cadeias de carboidrato ligado a N-glicosídeo ligadas à região Fc, em que menos de 50% das cadeias de carboidrato ligado a

N-glicosídeo do anticorpo na composição contém um resíduo de fucose.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que substancialmente nenhuma das cadeias de carboidrato ligado a N-glicosídeo de anticorpo na composição contém um resíduo de fucose.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada inclui (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e/ou em que a região variável de cadeia leve inclui (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada inclui (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 67-70; e/ou em que a região variável de cadeia leve inclui (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NO: 16 ou 21.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 11-14; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 23-24.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-14; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-24.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2-10; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 16-22.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs: 26-29;

(2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoáci-

do de SEQ ID NO: 61;

(3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs:31-36;

(4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62;

(5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs:38-43;

(6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e

(7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs: 45-46, e/ou

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs:48-49;

(2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64;

(3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NOs:51-53;

(4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65;

(5) um LC-FR3 compreendendo a sequência amino ácido selecionada a partir da SEQ ID NOs:55-58;

(6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e

(7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoáci-

do de SEQ ID NO: 26;

(2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61;

(3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 34;

(4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62;

(5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 38;

(6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e

(7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45; e/ou

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 48;

(2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64;

(3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51;

(4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65;

(5) um LC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 55;

(6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e

(7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(1) um HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 26;

(2) um HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61;

(3) um HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 34;

(4) um HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62;

(5) um HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 38;

(6) um HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63; e

(7) um HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45; e/ou

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(1) um LC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 48;

(2) um HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64;

(3) um LC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51;

(4) um HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65;

(5) um LC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 58;

(6) um HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66; e

(7) um LC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

uma região variável de cadeia pesada que compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 91, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 94; e/ou uma região variável de cadeia leve que compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 100, e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 103;

uma região variável de cadeia pesada que compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 92, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 95; e/ou uma região variável de cadeia leve que compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 101, e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 104; ou

uma região variável de cadeia pesada que compreende (i) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 93, e (iii) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 96; e/ou uma região variável de cadeia leve que compreende (i) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 102, e (iii) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 106; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 109; uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 107; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 110; ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 108; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 111.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a uma Siglec-8 humana e a uma Siglec-8 de primata não humana.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o primata não humano é um babuíno.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo no Domínio 1 de Siglec-8 humana, em que o Domínio 1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112.

34. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo no Domínio 3 de Siglec-8 humana, em que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114.

35. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 4F11.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo no Domínio 2 ou Domínio 3 de Siglec-8 humana.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o Domínio 2 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 113.

38. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 1C3.

39. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o Domínio 3 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 114.

40. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 1H10.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo no Domínio 1 de Siglec-8 humana e compete com o anticorpo 4F11 para ligação a Siglec-8.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o anticorpo não compete com o anticorpo 2E2 para ligação a Siglec-8.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o anticorpo não é anticorpo 2E2.

44. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o Domínio 1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 112.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, ou um anticorpo quimérico.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 45, caracterizado pelo fato de que o anticorpo esgota eosinófilos no sangue e inibe ativação de mastócitos.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 46, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região Fc de cadeia pesada compreendendo uma região Fc de IgG humana.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a região Fc de IgG humana compreende uma região Fc de IgG1 humana.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a região Fc de IgG1 humana é não fucosilada.

50. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a região Fc de IgG humana compreende uma região Fc de IgG4 humana.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a região Fc de IgG4 humana compreende a substituição de aminoácido S228P, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice EU tal como em Kabat.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo foi manipulado para melhorar a atividade de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

53. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc que melhora a atividade de ADCC.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 46, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma ou duas das cadeias pesadas do anticorpo é não fucosilada.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 75; e/ou uma cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácido selecionada a partir da SEQ ID NO: 76 ou 77.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em combinação com um ou mais agente terapêutico (s) adicional para tratar ou prevenir uma doença ocular alérgica.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o um ou mais agentes (s) terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo que consiste em um corticosteroide, anti-histamínico, cetotifeno, azelastina, epinastina, bepostatina, ciclosporina, e um agente anti-inflamatório não esteroide (NSAID).

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 59, caracterizado pelo fato de que a composição é uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo e um veículo farmacêuticamente aceitável.

61. Artigo de fabricação caracterizado pelo fato de que compreende um medicamento compreendendo uma composição compreendendo um anticorpo que se liga a Siglec-8 humana e uma bula de embalagem compreendendo instruções para a administração do medicamento em um indivíduo em necessidade do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR DOENÇAS OCULARES ALÉRGICAS"**.

A presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença ocular alérgica (por exemplo, conjuntivite alérgica, ceratoconjuntivite ou conjuntivite papilar gigante). Em particular, a presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença ocular alérgica através da administração de anticorpos que se ligam a Siglec-8 humana ou composições compreendendo os referidos anticorpos. A presente divulgação também fornece artigos de fabricação ou kits compreendendo anticorpos que se ligam a Siglec-8 humana para o tratamento de uma doença ocular alérgica.

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 P243490.TXT
- Data de Geração do Código: 31/10/2019
- Hora de Geração do Código: 16:08:40
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4A7DC50A5A89EDDA
 - Campo 2: 0F732FFE5AA942C2