

(11) Número de Publicação: **PT 2489364 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/06 (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)
C07K 16/46 (2015.01) **C07K 7/02** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.11.05	(73) Titular(es): SEATTLE GENETICS, INC. 21823 30TH DRIVE, S.E. BOTHELL, WA 98021US
(30) Prioridade(s): 2003.11.06 US 518534 P 2004.03.26 US 557116 P 2004.08.04 US 598899 P 2004.10.27 US 622455 P	(72) Inventor(es): PETER D. SENTER US MARK X. SLIWKOWSKI US SVETLANA O. DORONINA US BRIAN E. TOKI US ALLEN J. EBENS US
(43) Data de publicação do pedido: 2012.08.22	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.01.07 074/2015	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS DE MONOMETILVALINA CONJUGADOS COM ANTICORPOS**

(57) Resumo:

PÉPTIDOS AURISTATINA, INCLUINDO MEVAL-VAL-DIL-DAP- NOREFEDRINA (MMAE) E MEVAL-VAL-DIL-DAP-PHE (MMAF), FORAM PREPARADOS E UNIDOS A LIGANDOS ATRAVÉS DE VÁRIOS LIGANTES, INCLUINDO MALEIMIDOCAPROIL-VAL-CIT-PAB. OS CONJUGADOS DE FÁRMACO-LIGANDO RESULTANTES FORAM ATIVOS IN VITRO E IN VIVO.

RESUMO

COMPOSTOS DE MONOMETILVALINA CONJUGADOS COM ANTICORPOS

Péptidos auristatina, incluindo MeVal-Val-Dil-Dap-Norefedrina (MMAE) e MeVal-Val-Dil-Dap-Phe (MMAF), foram preparados e unidos a ligandos através de vários ligantes, incluindo maleimidocaproil-val-cit-PAB. Os conjugados de fármaco-ligando resultantes foram ativos *in vitro* e *in vivo*.

DESCRIÇÃO

COMPOSTOS DE MONOMETILVALINA CONJUGADOS COM ANTICORPOS

1. CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a conjugados de anticorpo-fármaco, a composições incluindo os mesmos, e a métodos para a utilização destes no tratamento de cancro, uma doença autoimune ou uma doença infecciosa. Também se descreve no presente documento métodos de utilização de compostos de conjugado de anticorpo-fármaco para o diagnóstico ou tratamento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamíferos, ou condições patológicas associadas.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Melhorar a administração de fármacos e outros agentes a células, tecidos e tumores alvos para atingir eficácia máxima e toxicidade mínima tem sido o objetivo central de pesquisas consideráveis durante muitos anos. Embora muitas tentativas tenham sido feitas para desenvolver métodos efetivos para importar moléculas biologicamente ativas para dentro das células, não foi provado, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que alguma delas seja inteiramente satisfatória. A otimização da associação do fármaco com seu alvo intracelular, ao mesmo tempo em que se minimiza a redistribuição intercelular do fármaco, por exemplo, para células vizinhas, é frequentemente difícil ou ineficiente.

A maioria dos agentes atualmente administrados parentericamente a um paciente não são direcionados, resultando em aplicação sistémica do agente a células e tecidos do corpo onde ele não é necessário, e frequentemente é indesejável. Isto pode resultar em efeitos secundários adversos do fármaco, e frequentemente limita a dose de um fármaco (por exemplo, agentes quimioterápicos (anti-cancro), citotóxicos, inibidores de enzimas e fármacos antivirais ou antimicrobianos) que pode ser

administrado. Em comparação, embora a administração oral de fármacos seja considerada um modo conveniente e económico de administração, apresenta os mesmos problemas de toxicidade não específica em células não afetadas após o fármaco ter sido absorvido na circulação sistémica. Complicações adicionais envolvem problemas com biodisponibilidade oral e residência do fármaco no intestino conduzindo à exposição adicional do intestino ao fármaco e, assim, ao risco de toxicidade no intestino. Consequentemente, um objetivo principal foi desenvolver métodos para direcionar agentes especificamente para células e tecidos. Os benefícios deste tratamento incluem evitar os efeitos fisiológicos gerais de aplicação inapropriada destes agentes a outras células e tecidos, tal como células não infetadas. O direcionamento intracelular pode ser obtido por métodos, compostos, e formulações que permitam o acúmulo ou retenção de agentes biologicamente ativos, isto é metabolitos ativos, dentro das células.

Terapêutica de anticorpo monoclonal foi estabelecida para o tratamento direcionado de pacientes com cancro, distúrbios imunológicos e angiogénicos.

A utilização de conjugados de anticorpo-fármaco para a administração local de agentes citotóxicos ou citostáticos, por exemplo, fármacos para destruir ou inibir células tumorais no tratamento de cancro (Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; Patente US N° 4975278) permite, teoricamente, a administração direcionada da fração de fármaco a tumores, e acúmulo intracelular nos mesmos, enquanto a administração sistémica destes agentes de fármaco não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade em células normais, assim como em células tumorais a serem eliminadas (Baldwin *et al.*, 1986, *Lancet* pág. (15 de Mar. de 1986):603-05; Thorpe, 1985, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer

Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), páginas 475-506). Eficácia máxima com toxicidade mínima é buscada. Tanto os anticorpos policlonais como os anticorpos monoclonais foram considerados úteis nestas estratégias (Rowland *et al.*, 1986, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Fármacos usados nestes métodos incluem daunomicina, doxorubicina, metotrexato, e vindesina (Rowland *et al.*, 1986, *supra*). Toxinas usadas em conjugados de anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas tais como toxina de difteria, toxinas de planta, tais como ricina, toxinas de molécula pequena tal como geldanamicina (Kerr *et al.*, 1997, *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784; Mandler *et al.* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Biogonjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoids (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), e caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). As toxinas podem afetar os seus efeitos citotóxicos e citostáticos por mecanismos incluindo ligação de tubulina, ligação de ADN, ou inibição de topoisomerase (Meyer, D. L. e Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" no "Annual Reports in Medicinal Chemistry", Volume 38 (2003), Capítulo 23, 229-237). Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inativos ou menos ativos quando conjugados com ligandos de recetor de proteínas ou anticorpos grandes.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) é um conjugado de anticorpo-radioisótopo composto de um anticorpo monoclonal IgG1 capa de murino direcionado contra o antígeno CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais ou malignos e radioisótopo ¹¹¹In ou ⁹⁰Y ligados por um quelador-ligante de tioureia (Wiseman *et al.* (2000) *Eur.*

Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262- 69). Embora ZEVALIN tenha atividade contra Linfoma não Hodgkin (LNH) de célula B, a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), um conjugado de fármaco e anticorpo composto de um anticorpo hu CD33 ligado à caliqueamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento de leucemia mieloide aguda por injeção (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patentes US N° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), um conjugado de anticorpo-fármaco composto do anticorpo huC₂₄2 ligado através do ligante de dissulfeto SPP à fração de fármaco maytansinoid, DM1, está a avançar a ensaios de Fase II para o tratamento de cancros que expressam CanAg, tal como do cólon, pancreático, gástrico, e outros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), um conjugado de anticorpo-fármaco composto do anticorpo monoclonal do antigénio de membrana específico anti-prostático (PSMA) ligado à fração de fármaco maytansinoid, DM1, está a ser desenvolvido para o tratamento potencial de tumores prostáticos. A mesma fração de fármaco maytansinoid, DM1, foi ligada através de um ligante não dissulfeto, SMCC, a um anticorpo monoclonal de murino de ratinho, TA.1 (Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131). Este conjugado foi considerado 200 vezes menos potente que o conjugado de ligante de dissulfeto correspondente. O ligante SMCC foi considerado aqui como "não clivável".

Vários compostos de péptido curtos foram isolados do molusco marinho *Dolabella auricularia* e descobriu-se que tinham atividade biológica (Pettit et al. (1993) Tetrahedron 49:9151; Nakamura et al. (1995) Tetrahedron

Letters 36:5059-5062; Sone *et al.* (1995) Jour. Org Chem. 60:4474). Análogos destes compostos foram também preparados, e descobriu-se que alguns tinham atividade biológica (para uma análise, veja-se Pettit *et al.* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277). Por exemplo, auristatina E (Patente US Nº 5635483) é um análogo sintético do produto natural marinho Dolastatina 10, um agente que inibe a polimerização de tubulina pela ligação ao mesmo domínio na tubulina que o fármaco anti-cancro vincristina (G.R. Pettit (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79). Dolastatina 10, auristatina PE, e auristatina E são péptidos lineares que têm quatro aminoácidos, três dos quais são únicos da classe dolastatina de compostos, e uma amida C-terminal.

Os péptidos auristatina, auristatina E (AE) e monometilauristatina (MMEAE), análogos sintéticos de dolastatina, foram conjugados em: (i) anticorpos monoclonais quiméricos CBR96 (específico para Lewis Y em carcinomas); (ii) cAC10 que é específico para CD30 em malignidades hematológicas (Klussman, *et al.* (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco *et al.* (2003) Blood 102(4):1458-1465; publicação PCT WO 2004/010957; Publicação US 2004/0018194; (iii) anticorpos anti-CD20 tais como RITUXAN® (documento WO 04/032828) para o tratamento de cancros que expressam CD20 e distúrbios imunológicos; (iv) anticorpos anti-EphB2 e anti-IL-8 para o tratamento de cancro colorretal (Mao, *et al.* (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) anticorpo de selectina E (Bhaskar *et al.* (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); e (vi) outros anticorpos anti-CD30 (documento WO 03/043583).

Auristatina E conjugada com anticorpos monoclonais são apresentadas por Senter *et al.*, Proceedings of the American

Association for Cancer Research, Volume 45, Número de Resumo 623, apresentado em 28 de Março de 2004.

Apesar dos dados *in vitro* para compostos da classe de dolastatina e seus análogos, toxicidades gerais significativas nas doses requeridas para atingir um efeito terapêutico comprometem sua eficácia em estudos clínicos. Consequentemente, existe uma necessidade clara na técnica para derivados de dolastatina/auristatina que tenham toxicidade significativamente menor, e ainda eficiência terapêutica útil. Estas e outras limitações e problemas do passado são considerados pela presente invenção.

A família de ErbB de cinases de tirosina de recetor são mediadores importantes do crescimento, diferenciação e sobrevivência da célula. A família do recetor inclui quatro membros distintos incluindo recetor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 ou p185^{neu}), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tyro2). Um painel de anticorpos anti-ErbB2 foi caracterizado usando a linha celular tumoral de mama humano SKBR3 (Hudziak *et al.*, (1989) Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172. Inibição máxima foi obtida com o anticorpo denominado 4D5 que inibiu a proliferação celular em 56 %. Outros anticorpos no painel reduziram a proliferação celular numa extensão menor nesta análise. Descobriu-se ainda que o anticorpo 4D5 sensibiliza linhas celulares de tumor de mama que sobre-expressam ErbB2 aos efeitos citotóxicos de TGF- α (Patente US N° 5677171). Os anticorpos anti-ErbB2 discutidos por Hudziak *et al.* são ainda caracterizados em Fendly *et al.* (1990) Cancer Research 40:1550-1558; Kotts *et al.* (1990) *In vitro* 26(3):59A; Sarup *et al.* (1991) Growth Regulation 1:72-82; Shepard *et al.* J. (1991) Clin. Immunol. 11 (3):117-127; Kumar *et al.* (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (2):979-986; Lewis *et al.* (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263; Pietras *et al.* (1994) Oncogene 9:1829-1838; Vitetta *et al.* (1994) Cancer Research 54:5301-5309; Sliwkowski *et al.*

(1994) J. Biol. Chem. 269(20):14661- 14665; Scott *et al.* (1991) J. Biol. Chem.. 266:14300-5; D'souza *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206; Lewis *et al.* (1996) Cancer Research 56:1457-1465; e Schaefer *et al.* (1997) Oncogene 15:1385-1394.

Outros anticorpos anti-ErbB2 com várias propriedades foram descritos em Tagliabue *et al.* Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.* Oncogene 4:543-548 (1989); Maier *et al.* Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.* Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* Proc. Nati Acad. Sci. USA 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.* Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.* int. J. Cancer 53:401-408 (1993); documento W094/00136; Kasprzyk *et al.* Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.* (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Shawver *et al.* (1994) Cancer Res. 54:1367-1373; Arteaga *et al.* (1994) Cancer Res. 54:3758-3765; Harwerth *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267:15160-15167; Patente US N° 5783186; e Klapper *et al.* (1997) Oncogene 14:2099-2109.

O rastreio de homologia resultou na identificação de dois outros membros da família do recetor ErbB; ErbB3 (Patente US N° 5.183.884; Patente US N° 5.480.968; KraU.S. *et al.* (1989) Proc. Nati Acad. Sci. USA 86:9193-9197) e ErbB4 (documento EP 599274; Plowman *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:1746-1750; e Plowman *et al.* (1993) Nature 366:473-475. Estes dois recetores apresentam expressão aumentada em pelo menos algumas linhas celulares de cancro de mama.

HERCEPTIN® (Trastuzumab) é um anticorpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se liga seletivamente com alta afinidade numa análise baseada em célula (Kd = 5 nM) ao domínio extracelular da proteína de recetor2 de fator de crescimento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (Patente US N° 5821337; Patente US N° 6054297; Patente US N° 6407213; Patente US N° 6639055; Coussens L,

et al. (1985) *Science* 230:1132-9; Slamon DJ, *et al.* (1989) *Science* 244:707-12). Trastuzumab é um anticorpo IgG1 capa que contém regiões de estrutura humana com as regiões de determinação de complementação de um anticorpo de murino (4D5) que se liga a HER2. Trastuzumab liga-se ao antigénio HER2 e, assim, inibe o crescimento de células cancerígenas. Devido ao fato de Trastuzumab ser um anticorpo humanizado, ele minimiza qualquer resposta HAMA nos pacientes. O anticorpo humanizado contra HER2 é produzido por uma suspensão de cultura de célula de mamífero (Ovário de Hamster Chinês, CHO). O protooncogene HER2 (ou c-erbB2) codifica uma proteína de recetor de transmembrana de 185 kDa, que é estruturalmente relacionada ao recetor de fator de crescimento epidérmico. A sobre-expressão da proteína HER2 é observada em 25 %-30 % de cancros de mama primários e pode ser determinada usando uma avaliação baseada em imunohistoquímica de blocos de tumor fixados (Press MF, *et al.* (1993) *Cancer Res* 53:4960-70. Trastuzumab demonstrou, em análises *in vitro* e em animais, inibir a proliferação de células tumorais humano que sobre-expressam HER2 (Hudziak RM, *et al.* (1989) *Mol Cell Biol* 9: 1165-72; Lewis GD, *et al.* (1993) *Cancer Immunol Immunother*; 37:255-63; Baselga J, *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:2825-2831). Trastuzumab é um mediador de citotoxicidade celular dependente de anticorpo ADCC (Hotaling TE, *et al.* (1996) [resumo], *Proc. Annual Meeting Am Assoe Cancer Res*; 37:471; Pegram MD, *et al.* (1997) [resumo], *Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res*; 38:602). *In vitro*, ADCC mediado por Trastuzumab demonstrou ser preferencialmente atuante em células cancerígenas que sobre-expressam HER2 comparado com células cancerígenas que não sobre-expressam HER2. HERCEPTIN® como agente único é indicado para o tratamento de pacientes com cancro de mama metastático cujos tumores sobre-expressam a proteína HER2 e que receberam um ou mais regimes de quimioterapia para sua doença metastática. HERCEPTIN® em combinação com paclitaxel

é indicado para o tratamento de pacientes com cancro de mama metastático cujos tumores sobre-expressam a proteína HER2 e que não receberam quimioterapia para a sua doença metastática. HERCEPTIN® é clinicamente ativo em pacientes com cancros de mama metastáticos que sobre-expressam ErbB2 que receberam terapêutica anti-cancro anterior extensiva (Baselga *et al.*, (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744).

O anticorpo anti-HER2 monoclonal de murino inibe o crescimento de linhas celulares de cancro de mama que sobre-expressam HER2 no nível 2+ e 3+ ($1-2 \times 10^6$ recetores HER2 por célula), mas não tem atividade em células que expressam níveis mais baixos de HER2 (Lewis *et al.*, (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263). Com base nesta observação, o anticorpo 4D5 foi humanizado (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Patente US Nº 5821337; Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289) e testado em pacientes com cancro de mama cujos tumores sobre-expressam HER2, mas que progrediram após quimioterapia convencional (Cobleigh *et al.*, (1999) J. Clin. Oncol. 17:2639-2648).

Embora HERCEPTIN seja um marco no tratamento de pacientes com cancros de mama que sobre-expressam ErbB2 que receberam terapêutica anti-cancro anterior extensiva, alguns pacientes nesta população não responderam ou responderam apenas muito pouco ao tratamento com HERCEPTIN.

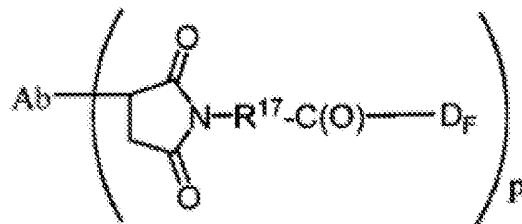
Portanto, existe uma necessidade clínica significativa para o desenvolvimento adicional de terapêuticas de cancro direccionadas para HER2 para aqueles pacientes com tumores que sobre-expressam HER2 ou outras doenças associadas com a expressão de HER2 que não respondem, ou respondem muito pouco, ao tratamento com HERCEPTIN.

A menção a qualquer referência neste pedido não é uma admissão de que a referência seja técnica anterior a este pedido.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um conjugado de

anticorpo-fármaco com a fórmula:



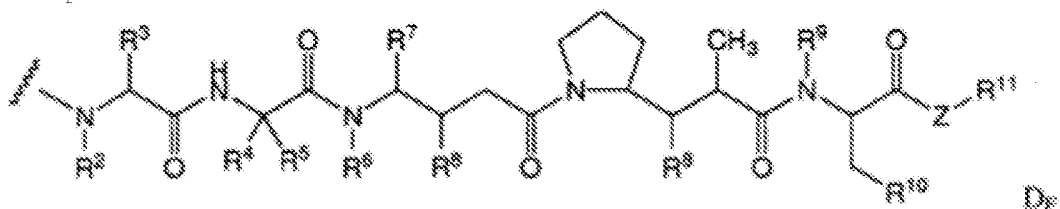
ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que

Ab é um anticorpo

R^{17} é alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-, -arileno-, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arileno-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, ou $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ -; e r é um número inteiro variando de 1 a 10;

P varia de 1 a cerca de 20, e

D_F é um unidade do fármaco com a fórmula:



em que, independentemente em cada localização:

R^2 é selecionado de H e alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$;

R^3 é selecionado de H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$, arilo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -arilo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$), heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$, e alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$);

R^4 é selecionado de H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$, arilo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -arilo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$), heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$, e alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$);

R^5 é selecionado de H e metilo;

ou:

R^4 e R^5 juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$, em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C_1-C_8 , e carbociclo C_3-C_8 , e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de arilo e heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH, ou NR^{12} , em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de -H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, -heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1 a 1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$; e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Também é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de conjugado de anticorpo-fármaco de acordo qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável desta, e um portador ou veículo farmacêuticamente aceitável.

Também é proporcionada uma composição para o tratamento de cancro compreendendo uma quantidade do conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato

farmaceuticamente aceitável desta, sendo a referida quantidade eficaz para tratar cancro.

Também é proporcionado um composto de conjugado de anticorpo-fármaco, conforme definido acima para utilização no tratamento de cancro, em que o referido tratamento de cancro compreende ainda opcionalmente o tratamento com um agente anticancerígeno adicional.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma análise de eficácia *in vivo*, de dose única subcutânea, de cAC10-mcMMAF em xenoenxertos de Karpas-299 ALCL.

A Figura 2 mostra uma análise de eficácia *in vivo*, de dose única subcutânea, de cAC10-mcMMAF em L540cy. Para este estudo havia 4 ratinhos no grupo não tratado e 10 em cada um dos grupos de tratamento.

As Figuras 3a e 3b mostram uma análise de eficácia *in vivo* de cBR96-mcMMAF em L2987 subcutânea. Os triângulos preenchidos na Figura 3a e setas na Figura 3b indicam os dias de terapêutica.

As Figuras 4a e 4b mostram atividade *in vitro* de conjugados de cAC10-anticorpo-fármaco contra linhas celulares CD30⁺.

As Figuras 5a e 5b mostram atividade *in vitro* de conjugados de cBR96-anticorpo-fármaco contra linhas celulares Le^{y+}.

As Figuras 6a e 6b mostram atividade *in vitro* de conjugados de c1 F6-anticorpo-fármaco contra linhas celulares de carcinoma de célula renal CD70⁺.

A Figura 7 mostra um ensaio de proliferação celular *in vitro* com células SK-BR-3 tratadas com conjugados de anticorpo-fármaco (ADC): -•- Trastuzumab-MC-vc-PAG-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -o- Trastuzumab-MC- MMAF, 4,1 MMAF/Ab, e -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab, medidos em Unidades de Fluorescência Relativa (ULR) contra concentração µg/ml de ADC. H = Trastuzumab onde H está ligado através

de uma cisteína [cys],

A Figura 8 mostra um ensaio de proliferação celular *in vitro* com células BT-474 tratadas com ADC: -- Trastuzumab-MC-vc-PAG-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, e -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab.

A Figura 9 mostra um ensaio de proliferação celular *in vitro* com células MCF-7 tratadas com ADC: -- Trastuzumab-MC-vc-PAG-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -- Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab, e -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab.

A Figura 10 mostra um ensaio de proliferação celular *in vitro* com células MDA-MB-468 tratadas com ADC: -- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab, -- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab, e -Δ- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.

A Figura 11 mostra um estudo de depuração de concentração plasmática após administração de H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG e H-MC-vc-PAB-MMAF a ratos Sprague-Dawley: A dose administrada foi de 2 mg de ADC por kg de rato. As concentrações de anticorpo total e ADC foram medidas durante o decorrer do tempo. (H = Trastuzumab).

A Figura 12 mostra um estudo de depuração de concentração plasmática após administração de H-MC-vc-MMAE a macacos *Cynomolgus* em doses diferentes: 0,5, 1,5, 2,5, e 3,0 mg/kg administradas no dia 1 e dia 21. As concentrações de anticorpo e ADC totais foram medidas durante o decorrer do tempo. (H = Trastuzumab).

A Figura 13 mostra a mudança de volume médio do tumor durante o tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosados no dia 0 com: veículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 $\mu\text{g}/\text{ml}^2$) e Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (555 $\mu\text{g}/\text{ml}^2$). (H = Trastuzumab).

A Figura 14 mostra a mudança de volume médio do tumor

durante o tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosados no Dia 0 com 10 mg/kg ($660 \mu\text{g}/\text{ml}^2$) de Trastuzumab-MC-MMAE e $1250 \mu\text{g}/\text{ml}^2$ de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE.

A Figura 15 mostra a mudança no volume médio do tumor com o passar do tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosados no Dia 0 com Veículo e $650 \mu\text{g}/\text{ml}^2$ de trastuzumab-MC-MMAF.

A Figura 16 mostra a mudança no volume médio de tumor com o tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosados no Dia 0 com veículo de $350 \mu\text{g}/\text{ml}^2$ de quatro conjugados de trastuzumab-MC-MMAF onde a proporção de MMAF/trastuzumab (H) é de 2, 4, 5, 9 e 6.

A Figura 17 mostra a mudança média no Grupo, com barras de erro, nos pesos corporais de animal (rato) (Média $\pm$ DP) após administração de Veículo, trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF e trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF.

A Figura 18 mostra a mudança média no Grupo nos pesos corporais de animal (rato) (Média $\pm$ DP) após administração de 9,94 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 24,90 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 10,69 mg/kg de H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF, 26,78 mg/kg de H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF, 10,17 mg/kg de H-MC-MMAF, 25,50 mg/kg de H-MC-MMAF, e 21,85 mg/kg de H-MC-vc-PAB-MMAF. H = trastuzumab. O ligante MC é unido através de uma cisteína de trastuzumab para cada conjugado.

A Figura 19 mostra a mudança média no Grupo, com barras de erro, nos pesos corporais de rato Sprague-Dawley (Média $\pm$ DP) após administração de trastuzumab (H)-MC-MMAF em doses de 2105, 3158, e $4210 \mu\text{g}/\text{ml}^2$. O ligante MC é unido através de uma cisteína de trastuzumab para cada conjugado.

4. DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO EXEMPLARES

4.1 DEFINIÇÕES E ABREVIÇÕES

A não ser que mencionado de outro modo, os termos e frases a seguir, conforme usados no presente documento, visam ter os seguintes significados:

Quando nomes comerciais são usados no presente documento, os requerentes objetivam incluir independentemente a formulação do produto de nome comercial, o fármaco genérico, e o(s) ingrediente(s) farmacologicamente ativo(s) do produto de nome comercial.

O termo "anticorpo" é usado no presente documento no seu sentido mais amplo e abrange, especificamente, anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados por pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpo, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada. Um anticorpo é uma proteína gerada pelo sistema imunológico que é capaz de reconhecer e ligar-se a um antígeno específico. Descrito em termos de sua estrutura, um anticorpo tipicamente tem uma proteína de formato Y consistindo de quatro cadeias de aminoácidos, duas pesadas e duas leves. Cada anticorpo possui duas regiões primárias: uma região variável e uma região constante. A região variável está localizada nas extremidades dos braços do Y, ligam-se e interagem com o antígeno alvo. Esta região variável inclui uma região de terminação complementar (CDR) que reconhece e se liga a um local de ligação específico num antígeno específico. A região constante, localizada na cauda do Y, é reconhecida e interage com o sistema imunológico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, Nova York). Um antígeno alvo geralmente tem numerosos locais de ligação, também denominados epítomos, reconhecidos por CDRs em anticorpos

múltiplos. Cada anticorpo que especificamente se liga a um epítopo diferente possui uma estrutura diferente. Dessa maneira, um antígeno pode ter mais que um anticorpo correspondente.

O termo "anticorpo" conforme usado no presente documento, também se refere a uma molécula de imunoglobulina de comprimento total ou uma fração imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina, isto é, uma molécula que contém um local de ligação de antígeno que se liga imuno especificamente a um antígeno de um alvo de interesse ou parte do mesmo, tais alvos incluindo, mas não limitados a célula ou células cancerígenas que produzem anticorpos autoimunes associados a uma doença autoimune. A imunoglobulina revelada no presente documento pode ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. As imunoglobulinas podem ser derivadas de qualquer espécie. Num aspeto, entretanto, a imunoglobulina é de origem humana, de murino, ou de coelho. Num outro aspeto, os anticorpos são policlonais, monoclonais, biespecíficos, humanos, humanizados ou anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia única, Fv, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão Fab, anticorpos anti-idióticos (anti-Id), CDR's, e fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos acima que se liga imuno especificamente a antígenos de célula cancerígena, antígenos virais ou antígenos microbianos.

O termo "anticorpo monoclonal" conforme usado no presente documento refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que possam estar presentes em quantidades mínimas.

Anticorpos monoclonais são altamente específicos, estando direcionados contra um local antigénico único. Além do mais, em contraste com preparações de anticorpo policlonal que incluem anticorpos diferentes direcionados contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticorpo monoclonal está direcionado contra um único determinante no antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos visto que podem ser sintetizados de forma não contaminada por outros anticorpos. O modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser considerada como requerendo produção de anticorpo por um método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, ou pode ser feito por métodos de ADN recombinante (veja-se, Patente US N° 4816567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados de bibliotecas de anticorpo de fagos usando as técnicas descritas em Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628 e Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, por exemplo.

Os anticorpos monoclonais no presente documento incluem especificamente anticorpos "quiméricos" nos quais uma fração da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencente a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, assim como fragmentos destes anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente US N° 4816567; e Morrison et al. (1984)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855).

Vários métodos foram utilizados para produzir anticorpos monoclonais (MAbs). Tecnologia de hibridoma, a qual se refere a uma linha celular clonada que produz um tipo único de anticorpo, usa as células de várias espécies, incluindo ratinhos (murino), hamsters, ratos, e humanos. Um outro método para preparar MAbs usa engenharia genética incluindo técnicas de ADN recombinante. Anticorpos monoclonais feitos a partir destas técnicas incluem, entre outros, anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados. Um anticorpo quimérico combina regiões de codificação de ADN de mais de um tipo de espécie. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode derivar uma região variável de um ratinho e a região constante de um ser humano. Um anticorpo humanizado origina-se predominantemente de um ser humano, embora contenha porções não humanas. Como um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado pode conter uma região constante completamente humana. Mas, diferente de um anticorpo quimérico, a região variável pode ser parcialmente derivada de um ser humano. As porções não humanas, sintéticas, de um anticorpo humanizado frequentemente advêm de CDRs em anticorpos de murino. Em qualquer caso, estas regiões são cruciais para permitir que o anticorpo reconheça e se ligue a um antigénio específico.

Conforme observado, anticorpos de murino podem ser usados. Embora úteis para diagnósticos e terapêuticas de curta duração, anticorpos de murino não podem ser administrados a pessoas por um período longo sem aumentar o risco de uma resposta imunogénica prejudicial. Esta resposta, denominada Anticorpo Humano Anti-Ratinho (HAMA), ocorre quando o sistema imunológico humano reconhece o anticorpo murino como estrangeiro e o ataca. Uma resposta HAMA pode causar choque tóxico ou mesmo a morte.

Anticorpos quiméricos e humanizados reduzem a probabilidade de uma resposta HAMA pela minimização das

porções não humanas de anticorpos administrados. Além do mais, anticorpos quiméricos e humanizados possuem o benefício adicional de ativar respostas imunológicas humanas secundárias, tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma fração de um anticorpo intacto, preferivelmente que compreende a região de ligação de antígeno ou variável do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmento(s) de anticorpo.

Um anticorpo "intacto" é aquele que compreende uma região variável de ligação ao antígeno, assim como um domínio constante de cadeia leve (CL) e domínios constantes de cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humana) ou variante de sequência de aminoácido dos mesmos.

O anticorpo intacto pode ter uma ou mais "funções de efetor" que se referem àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de variante de sequência de aminoácido) de um anticorpo. Exemplos de funções de efetor de anticorpo incluem ligação C₁q; citotoxicidade dependente de complemento; ligação de recetor Fc; citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; subregulação de recetores de superfície de célula (por exemplo, recetor de célula B, BCR), etc.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, anticorpos intactos podem ser designados a diferentes "classes". Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem ser ainda divididas em "subclasses" (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3,

IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são denominadas α , δ , μ , γ , e ϵ respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de classes diferentes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

A expressão "ErbB2" e "HER2" são usadas de forma intercambiável no presente documento e referem-se à proteína HER2 humana descrita, por exemplo, em Semba *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto *et al.*, (1986) Nature 319:230-234 (Número de acesso do Genbank X03363). O termo "erbB2" refere-se ao gene que codifica ErbB2 humano e "neu" refere-se ao gene que codifica p185neu de rato. ErbB2 preferido é a sequência nativa humana ErbB2.

Anticorpos para recetores ErbB estão disponíveis comercialmente a partir de uma série de fontes, incluindo, por exemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Califórnia, EUA.

Por "ligando de ErbB" entende-se um polipéptido que se liga e/ou ativa um recetor ErbB. O ligando de ErbB pode ser um ligando de ErbB humano de sequência nativa tal como o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Savage *et al.* (1972) J. Biol. Chem. 247:7612-7621); fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α) (Marquardt *et al.* (1984) Science 223:1079-1082); anfirregulina, também conhecida como schwanoma ou fator de crescimento autócrino de queratinócito (Shoyab *et al.* (1989) Science 243:1074-1076; Kimura *et al.*, Nature, 348:257-260 (1990); e Cook *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, Science, 259:1604-1607 (1993); e Sasada *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 190:1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, Science, 251:936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda *et al.*, J. Biol. Chem., 270:7495-7500 (1995); e Komurasaki *et al.*, Oncogene, 15:2841-2848

(1997)); uma herregulina (veja-se a seguir); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature*, 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562- 9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari *et al.* *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)) ou cripto (CR-1) (Kannan *et al.* *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). Ligandos ErbB que se ligam a EGFR incluem EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, HB-EGF e epirregulina. Ligandos ErbB que se ligam a ErbB3 incluem herregulinas. Ligandos ErbB capazes de ligação a ErbB4 incluem betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 e herregulinas. O ligando de ErbB pode também ser um ligando de ErbB sintético. O ligando sintético pode ser específico para um recetor ErbB específico, ou pode reconhecer complexos específicos de recetor ErbB. Um exemplo de um ligando sintético é a herregulina/birregulina EGF quimera sintética (veja-se, por exemplo, Jones *et al.*, (1999) *FEBS Letters*, 447:227-231).

"Herregulina" (HRG) refere-se a um polipéptido codificado pelo produto do gene herregulina conforme revelado na Patente US N° 5641869 ou Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993). Exemplos de herregulinas incluem herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 e herregulina- β 3 (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); e Patente US N° 5641869); fator de diferenciação neu (NDF) (Peles *et al.*, *Cell* 69:205-216 (1992)); atividade induzida por recetor de acetilcolina (ARIA) (Falisi *et al.* (1993) *Cell* 72:801 -815); fatores de crescimento gliais (GGFs) (Marchionni *et al.* *Nature*, 362:312-318 (1993)); fator derivado de neurónio sensorial e motor (SMDF) (Ho *et al.* *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ -regulina (Schaefer *et al.* *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). O termo inclui fragmentos biologicamente ativos e/ou variantes de sequência de aminoácidos de um polipéptido HRG de sequência nativa, tal como um fragmento de domínio tipo EGF do mesmo

(por exemplo, HRG β 1177-244).

"Hetero-oligômero ErbB" é um oligômero não covalentemente associado que compreende pelo menos dois recetores ErbB diferentes. Um "dímero ErbB" é um oligômero não covalentemente associado que compreende dois recetores ErbB diferentes. Estes complexos podem formar-se quando uma célula que expressa dois ou mais recetores ErbB é exposta a um ligando de ErbB. Oligômeros ErbB, tais como dímeros ErbB, podem ser isolados por imunoprecipitação e analisados por SDS-PAGE conforme descrito em Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994), por exemplo. Exemplos destes hetero-oligômeros ErbB incluem complexos EGFR-ErbB2 (também referidos como HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) e ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Além do mais, o hetero-oligômero ErbB pode compreender dois ou mais recetores ErbB2 combinados com um recetor ErbB diferente, tal como ErbB3, ErbB4 ou EGFR (ErbB1). Outras proteínas, tais como uma subunidade do recetor de citocina (por exemplo, gp130) podem ser incluídas no hetero-oligômero.

Um polipéptido de "sequência nativa" é aquele que tem a mesma sequência de aminoácidos que um polipéptido, por exemplo, recetor de antigénio associado com tumor, derivado da natureza. Estes polipéptidos de sequência nativa podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos por meios recombinantes ou sintéticos. Dessa maneira, um polipéptido de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácido de polipéptido humano de ocorrência natural, polipéptido de murino, ou polipéptido de qualquer outra espécie de mamíferos.

O termo "variante de sequência de aminoácidos" refere-se a polipéptidos que tem sequências de aminoácidos que diferem em alguma extensão de um polipéptido de sequência nativa. Ordinariamente, variantes de sequência de aminoácidos possuirão pelo menos cerca de 70 % de homologia com pelo menos um domínio de ligação do recetor de um

ligando nativo, ou com pelo menos um domínio de ligação a ligando de um recetor nativo, tal como um antigénio associado a tumor, e preferivelmente, eles serão pelo menos cerca de 80 %, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 90 % homólogos a estes domínios de ligação de recetor ou ligando. As variantes de sequência de aminoácidos possuem substituições, deleções, e/ou inserções em certas posições dentro da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos nativa.

"Identidade de sequência" é definida como a percentagem de resíduos na variante de sequência de aminoácido que são idênticos após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessários, para atingir o percentual máximo de identidade de sequência. Métodos e programas de computador para o alinhamento são bem conhecidos na técnica. Um destes programas de computador é o "Align 2", da Genentech, Inc., que foi depositado com documentação de utilizador na United States Copyright Office, Washington, DC 20559, em 10 de dezembro de 1991.

"Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" e "ADCC" refere-se a uma reação mediada pela célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam recetores Fc (FcRs) (por exemplo, células *natural killer* (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem um anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causam a lise da célula alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam apenas Fc γ RIII, enquanto monócitos expressam Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas é resumida no quadro 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92. Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, uma análise *in vitro* de ADCC, tal como aquela descrita na Patente US N° 5500362 ou 5821337 pode ser executada. Células efectoras úteis para estas análises

incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) e células *natural killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como aquele revelado em Clynes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:652-656 (1998).

Os termos "recetor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um recetor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além do mais, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um recetor gama) e inclui recetores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII, e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas unidas destes recetores. Recetores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um "recetor ativador") e Fc γ RIIB (um "recetor inibidor"), que possuem sequências de aminoácidos semelhantes que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. O recetor ativador Fc γ RIIA contém um motivo de ativação baseado no imunorrecetor tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O recetor inibidor Fc γ RIIB contém um motivo de inibição baseado no imunorrecetor tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (Veja-se análise M. no Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). FcRs são analisados por Ravetch e Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods, 4:25-34 (1994); e de Haas *et al.*, J. Lab. clin. Med., 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são abrangidos pelo termo "FcR" no presente documento. O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto. (Guyer *et al.*, J. Immunol., 117:587 (1976) e Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" refere-se à capacidade de uma molécula para lisar um alvo na presença do complemento. O caminho de ativação do

complemento é iniciado pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C_1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) complexado com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação de complemento, uma análise CDC, por exemplo, conforme descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996), pode ser realizada.

O termo "variável" refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente na sequência entre anticorpos e são usados na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para o seu antígeno específico. Entretanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente em todos os domínios variáveis de anticorpos. É concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis de cadeia leve quanto nos de cadeia pesada. As porções mais bem conservadas de domínios variáveis são denominadas de regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve nativas, cada um, compreendem quatro FRs, principalmente adotando uma forma de realização de folha β , conectada por três regiões hipervariáveis, que formam alças conectando, e em alguns casos constituindo uma parte da estrutura de folha β . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação de antígeno de anticorpos (veja-se Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções de efetor, tal como participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC).

O termo "região hipervariável" quando usado no presente documento refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação de antígeno.

A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácidos de uma "região de determinação de complementação" ou "CDR" (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al. supra*) e/ou aqueles resíduos de uma "alça hipervariável" (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917). Resíduos de "Região de Estrutura" ou "FR" são aqueles resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de região hipervariável conforme definidos no presente documento.

Digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um local de ligação de antígeno único, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade para cristalizar prontamente. Tratamento com pepsina resulta num fragmento $F(ab')_2$ que possui dois locais de ligação de antígeno e é ainda capaz de reticular o antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento de antígeno e ligação de antígeno. Esta região consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação próxima, não covalente. É nesta forma de realização que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir o local de ligação de antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a capacidade para reconhecer e ligar-se a antígeno,

embora numa afinidade menor do que aquela do local de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos do terminal carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação no presente documento para Fab' na qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes suporta(m) pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpo F(ab')₂ originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos de qualquer espécie vertebrada podem ser designadas a um dentre dois tipos claramente distintos, denominado capa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácido dos seus domínios constantes.

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios VH e VL de anticorpo, onde estes domínios estão presentes numa cadeia de polipéptido única. Preferivelmente, o polipéptido Fv compreende ainda um ligante de polipéptido entre os domínios VH e VL que permite ao scFv formar a estrutura desejada para ligação de antigénio. Para uma análise de scFv, veja-se Plückthun em "The Pharmacology of Monoclonal antibodies", vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nova York, páginas 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação de antigénio, cujos fragmentos compreendem um domínio pesado variável (VH) conectado a um domínio leve variável (VL) na mesma cadeia de polipéptido (VH - VL). Através da utilização de um

ligante que é muito curto para permitir a formação de pares entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a formar um par com os domínios complementares de uma outra cadeia e criar dois locais de ligação de antigénio. Diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, na EP 404.097; documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, roedores) são anticorpos quiméricos que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nos quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como ratinho, rato, coelho ou primata não humano, que tem a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além do mais, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. No geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente tudo dentre pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os FRs são aqueles de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma fração de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para pormenores adicionais, veja-se Jones *et al.* (1986) Nature, 321:522:525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-329; e

Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596.

Anticorpos anti-ErbB2 humanizados incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) conforme descrito no quadro 3 da Patente US N° 5821337; anticorpos 520C9 humanizados (documento WO93/21319) e anticorpos 2C4 humanizados são descritos no presente documento a seguir.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com o diagnóstico ou utilizações terapêuticas para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas, e outros solutos proteicos ou não proteicos. Nas formas de realização preferidas, o anticorpo será purificado (1) em mais que 95 % em peso do anticorpo, conforme determinado pelo método de Lowry, e mais preferivelmente mais que 99 % em peso, (2) a um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna através da utilização de um sequenciador de copo giratório, ou (3) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul de Coomassie ou, preferivelmente, coloração com prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes visto que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Ordinariamente, entretanto, anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

Um anticorpo "que se liga" a um antígeno de interesse é aquele capaz de se ligar àquele antígeno com afinidade suficiente de modo que o anticorpo seja útil para ser direcionado a uma célula que expressa o antígeno.

Um anticorpo que "induz apoptose" é aquele que induz morte programada de célula conforme determinado pela ligação de anexina V, fragmentação de ADN, encolhimento da

célula, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação de célula, e/ou formação de vesículas de membrana (denominados corpos apoptóticos). A célula é uma célula tumoral, por exemplo, uma célula de mama, do ovário, estomacal, endométrica, da glândula salivar, pulmão, rins, cólon, tireoide, pancreática ou da bexiga. Vários métodos estão disponíveis para avaliar os eventos celulares associados a apoptose. Por exemplo, translocação de fosfatidil serina (PS) pode ser medida pela ligação de anexina; fragmentação de ADN pode ser avaliada através de escalonamento de ADN; e condensação nuclear/cromatina juntamente com fragmentação de ADN pode ser avaliada por qualquer aumento nas células hipodiploides.

Um "distúrbio" é qualquer condição que beneficiaria de tratamento da presente invenção. Isto inclui distúrbios crónicos e agudos ou doenças incluindo estas condições patológicas que predispõem o mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitativos de distúrbios a serem tratados no presente documento incluem tumores benignos e malignos; leucemia e malignidades linfoides, em especial cancro de mama, ovário, estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rins, cólon, tireoide, pâncreas, próstata ou bexiga; distúrbios neuronais, gliais, astrócitos, hipotalâmicos e outros distúrbios glandulares, de macrófagos, epiteliais, estromais e blastocóelicos; e distúrbios inflamatórios, angiogénicos e imunológicos.

O termo "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar uma doença ou distúrbio num mamífero. No caso de cancro, a quantidade terapêuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerígenas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, diminuir em alguma extensão e preferivelmente cessar) a infiltração de células cancerígenas nos órgãos periféricos; inibir (isto é, diminuir em alguma extensão e preferivelmente cessar)

metástase de tumor; inibir, em alguma extensão, o crescimento do tumor; e/ou aliviar em alguma extensão um ou mais dos sintomas associados a o cancro. Na extensão em que o fármaco pode impedir o crescimento e/ou destruir as células cancerígenas existentes, pode ser citostático e/ou citotóxico. Para terapêutica de cancro, a eficácia pode, por exemplo, ser medida pela avaliação do tempo de progressão da doença (TTP) e/ou determinação da taxa de resposta (RR).

O termo "quantidade substancial" refere-se a uma maioria, isto é, >50 % de uma população, de um conjunto ou uma amostra.

O termo "metabolito intracelular" refere-se a um composto resultante de um processo ou reação metabólica dentro de uma célula num conjugado de anticorpo-fármaco (ADC). O processo ou reação metabólica pode ser um processo enzimático tal como clivagem proteolítica de um ligante de péptido do ADC, ou hidrólise de um grupo funcional tal como hidrazona, éter, ou amida. Metabolitos intracelulares incluem, mas não se limitam a anticorpos e fármaco livre que sofreram clivagem intracelular após a entrada, difusão, absorção ou transporte para dentro de uma célula.

Os termos "intracelularmente clivado" e "clivagem intracelular" referem-se a um processo ou reação metabólica dentro de uma célula num Conjugado de Fármaco-Ligando, um Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando, e um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) ou semelhante pelo qual a união covalente, por exemplo, o ligante, entre a fração de fármaco (D) e o anticorpo (Ab) é quebrada, resultando no fármaco livre dissociado do anticorpo dentro da célula. As porções clivadas do Conjugado de Fármaco-Ligando, um Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando ou ADC são, dessa maneira, metabolitos intracelulares.

O termo "biodisponibilidade" refere-se à disponibilidade sistémica (isto é, níveis

sanguíneos/plasmáticos) de uma quantidade dada de fármaco administrado a um paciente. A biodisponibilidade é um termo absoluto que indica a medição do tempo (taxa) e a quantidade total (extensão) de fármaco que atinge a circulação geral de uma forma farmacêutica administrada.

O termo "atividade citotóxica" refere-se a um efeito de eliminação de célula, citostático ou anti-proliferação de um composto conjugado de anticorpo-fármaco ou um metabolito intracelular de um composto conjugado de anticorpo-fármaco. A atividade citotóxica pode ser expressa como o valor IC_{50} que é a concentração (molar ou massa) por volume unitário na qual metade das células sobrevive.

Os termos "cancro" e "cancerígeno" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento não regulado de células. Um "tumor" compreende uma ou mais células cancerígenas. Exemplos de cancro incluem, mas não se limitam a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais específicos destes cancros incluem cancro de célula escamosa (por exemplo, cancro de célula escamosa epitelial), cancro do pulmão incluindo cancro de pulmão de célula pequena, cancro do pulmão de célula não pequena ("NSCLC"), adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou estomacal, incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro retal, cancro colorretal, carcinoma do endométrio ou uterino, carcinoma da glândula salivar, cancro dos rins ou renal, cancro da próstata, cancro da vulva, cancro da tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, assim como cancro da cabeça e pescoço.

Um "cancro que expressa ErbB2" é aquele que produz

níveis suficientes de ErbB2 na superfície de células do mesmo, de modo que um anticorpo anti-ErbB2 pode ligar-se às mesmas e ter um efeito terapêutico em relação ao cancro.

Um cancro "caracterizado por ativação excessiva" de um recetor ErbB2 é aquele em que a extensão de ativação de recetor ErbB2 nas células cancerígenas excede significativamente o nível de ativação daquele recetor em células não cancerígenas do mesmo tipo de tecido. Esta ativação excessiva pode resultar da sobre-expressão do recetor ErbB2 e/ou de níveis maiores que o normal de um ligando de ErbB2 disponível para ativar o recetor ErbB2 nas células cancerígenas. Esta ativação excessiva pode causar e/ou ser causada pelo estado maligno de uma célula cancerígena. Em algumas formas de realização, o cancro será submetido a uma análise de diagnóstico ou prognóstico para determinar se a amplificação e/ou sobre-expressão de um recetor ErbB2 está ocorrendo, que resulte nesta ativação excessiva do recetor ErbB2. Alternativamente, ou adicionalmente, o cancro pode ser submetido a uma análise de diagnóstico ou prognóstico para determinar se a amplificação e/ou sobre-expressão de um ligando de ErbB2 está ocorrendo no cancro, o que é atribuído à ativação excessiva do recetor. Num subconjunto destes cancros, ativação excessiva do recetor pode resultar numa via de estimulação autócrina.

Um cancro que "sobre-expressa" um recetor ErbB2 é aquele que tem níveis significativamente mais elevados de um recetor ErbB2 na superfície da célula do mesmo, comparado com uma célula não cancerígena do mesmo tipo de tecido. Esta sobre-expressão pode ser causada por amplificação de gene ou por transcrição ou tradução aumentada. A sobre-expressão do recetor ErbB2 pode ser determinada numa análise de diagnóstico ou prognóstico através da avaliação dos níveis aumentados da proteína ErbB2 presentes na superfície de uma célula (por exemplo,

através de uma análise de imunohistoquímica; IHC). Alternativamente, ou adicionalmente, os níveis de ácido nucleico que codifica ErbB2 na célula podem ser medidos, por exemplo, através de técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH; veja-se documento WO 98/45479), *southern blotting*, ou reação em cadeia por polimerase (PCR), tais como PCR quantitativa de tempo real (RT-PCR). A sobre-expressão do ligando de ErbB2 pode ser determinada por diagnóstico através da avaliação dos níveis do ligando (ou ácido nucleico que codifica o mesmo) no paciente, por exemplo, numa biopsia de tumor ou através de várias análises de diagnóstico, tal como IHC, FISH, *southern blotting*, PCR ou análises *in vivo* descritas acima. A sobre-expressão do recetor ErbB2 pode também ser estudada através da medição do antigénio livre em circulação (por exemplo, domínio extracelular ErbB2) num fluido biológico tal como soro (veja-se, por exemplo, Patente US N° 4933294; documento WO 91/05264; Patente US N° 5401638; e Sias *et al.*, (1990) J. Immunol. Methods, 132:73-80). Além das análises acima, várias outras análises *in vivo* estão disponíveis para o técnico especializado. Por exemplo, as células podem ser expostas dentro do corpo do paciente a um anticorpo que seja opcionalmente marcado com um rótulo detetável, por exemplo, um isótopo radioativo, e a ligação do anticorpo às células no paciente pode ser avaliada, por exemplo, por rastreio externo quanto à radioatividade ou pela análise de uma biopsia retirada de um paciente previamente exposto ao anticorpo.

Os tumores que sobre-expressam HER2 são classificados por pontuações de imunohistoquímica correspondendo ao número de cópias de moléculas de HER2 expressas por célula, e podem ser determinadas bioquimicamente: 0 = 0-10.000 cópias/célula, 1+ = pelo menos cerca de 200.000 cópias/célula, 2+ = pelo menos cerca de 500.000 cópias/célula, 3+ = cerca de $1-2 \times 10^6$ cópias/célula. A

sobre-expressão de HER2 no nível 3+, que conduz a ativação independente de ligando da cinase de tirosina (Hudziak *et al.*, (1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163), ocorre em cerca de 30 % dos câncros da mama, e nestes pacientes, a sobrevivência isenta de recidiva e a sobrevivência geral são diminuídas (Slamon *et al.*, (1989) Science, 244:707-712; Slamon *et al.*, (1987) Science, 235:177-182).

Inversamente, um câncer que "não seja caracterizado por sobre-expressão do receptor ErbB2" é aquele que, numa análise de diagnóstico, não expressa níveis mais elevados que o normal de receptor ErbB2 se comparado a uma célula não cancerígena do mesmo tipo de tecido.

O termo "agente citotóxico" conforme usado no presente documento refere-se a uma substância que inibe ou impede a função de células e/ou causa destruição de células. O termo objetiva incluir isótopos radioativos (por exemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ⁶⁰C, e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, e toxinas tais como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo análogos sintéticos e derivados dos mesmos. Num aspecto, o termo não se destina a incluir isótopos radioativos.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes de alquilação tais como tiotepa e CYTOXAN® ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol,

MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicina; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo o seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (especificamente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostarda nitrogenada tal como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina; bisfosfonatos, tal como clodronato; antibióticos tais como o antibiótico enediína (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 11 e caliqueamicina ômega 11) (veja-se, por exemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)) e antraciclinas tais como anamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorrubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarrubicina, KRN5500, menogaril, dinemicina, incluindo dinemicina A, uma esperamicina, cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antibióticos de enediína de cromoproteína relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina lipossomal, e desoxidoxorrubicina), esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido

micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, e zorrubicina; análogos de ácido fólico tais como denopterina, pteropterina, e trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, e tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, e floxuridina; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, e testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, e trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antifolato antineoplásticos tais como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inibidores de redutase de diidrofolato tais como metotrexato, antimetabolitos tais como 5-fluorouracil (5-FU) e seus pró-fármacos tais como UFT, S-1 e capecitabina, e inibidores de sintase de timidilato e inibidores de formiltransferase de glicinamida ribonucleótido tais como raltitrexed (TOMUDEX™, TDX); inibidores de desidrogenase de diidropirimidina tais como eniluracil; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico, amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinano; lonidainina; maytansinoids tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilidrazida; procarbazona; PSK® complexo de polissacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®,

FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol, mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides e taxanos, por exemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremophor-free, formulação de paclitaxel com nanopartícula manipulada de albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); cloranbucil; gencitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platina; análogos de platina ou análogos a base de platina tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vimblastina (VELBAN®), etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona, vincristina (ONCONVIN®); alcaloide vinca; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato, daunomicina; aminopterina; xeloda, ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tais como ácido retinoico; sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos acima; assim como combinações de dois ou mais dos acima tal como CHOP, uma abreviação para uma terapêutica combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nesta definição estão agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação de hormonas em tumores tais como antiestrogénios e moduladores de recetor seletivo de estrogénio, incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, e FARESTON® toremifena; inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase que regula a produção de estrogénio nas glândulas adrenais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestano,

fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, e ARIMIDEX® anastrozol; e antiandrogénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserrelina; assim como troxacitabina, um análogo de 1,3-dioxolano nucleosídeo citosina); oligonucleótidos antissense, especificamente aqueles que inibem a expressão de genes nas vias de sinalização implicadas na proliferação celular aberrante, tal como, por exemplo, alfa PKC, Raf, H-Ras, e recetor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas tais como vacinas de terapêutica génica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inibidor de topoisomerase 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer um dos acima.

Conforme usado no presente documento, o termo "fármaco direcionado a EGFR" refere-se a um agente terapêutico que se liga a EGFR e, opcionalmente, inibe a ativação de EGFR. Exemplos destes agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que se ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos que se ligam a EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (veja-se Patente US N° 4943533, Mendelsohn *et al.*) e variantes dos mesmos, tais como 225 quimerizado (C₂₂₅ ou Cetuximab; ERBITUX® e 225 reformatado humano (H225) (veja-se, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticorpos que se ligam a EGFR mutante tipo II (Patente US N° 5.212.290); anticorpos humanizados e quiméricos que se ligam a EGFR conforme descrito na Patente US N° 5891996; e anticorpos humanos que se ligam a EGFR, tal como ABX-EGF (veja-se documento WO 98/50433, Abgenix). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente citotóxico, dessa maneira gerando um imunoconjugado (veja-se, por exemplo, documento EP 659.439A2, Merck Patent GmbH). Exemplos de moléculas pequenas que se ligam a EGFR incluem ZD1839 ou Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca);

Erlotinib HCl (CP-358774, TARCEVA™; Genentech/OSI) e AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Um "inibidor de tirosina-cinase" é uma molécula que inibe em alguma extensão a atividade de uma tirosina-cinase tal como um recetor ErbB. Exemplos destes inibidores incluem os fármacos direccionados para EGFR observados no parágrafo anterior, assim como quinazolininas tais como PD 153035, 4 (3-cloroanilino)quinazolinina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706, e pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas, curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida), tirfostinas contendo porções de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antissense (por exemplo, aquelas que se ligam a ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (Patente US N° 5.804.396); trifostinas (Patente US N° 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK- 787 (Novartis/Schering AG); inibidores pan-ErbB tais como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesilato (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxanib (Sugen); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); ou conforme descrito em qualquer uma das publicações de patentes a seguir: Patente US N° 5804396; documento WO 99/09016 (American Cyanamid); documento WO 98/43960 (American Cyanamid); documento WO 97/38983 (Warner Lambert); documento WO 99/06378 (Warner Lambert); documento WO 99/06396 (Warner Lambert); documento WO 96/30347 (Pfizer, Inc.); documento WO 96/33978 (Zeneca); documento WO 96/3397 (Zeneca); e documento WO 96/33980 (Zeneca).

Um "agente antiangiogénico" refere-se a um composto que bloqueia, ou interfere em algum grau, com o desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator antiangiogénico pode, por exemplo, ser uma molécula pequena

ou anticorpo que se liga a um fator de crescimento ou recetor de fator de crescimento envolvido na promoção de angiogénese. Numa forma de realização, o fator antiangiogénico é um anticorpo que se liga a Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).

O termo "citocina" é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população de célula que agem numa outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos destas citocinas são linfocinas, monocinas, e hormonas de polipéptido tradicionais. Incluídos entre as citocinas estão hormona de crescimento tal como hormona de crescimento humano, hormona de crescimento humano N-metionilo, e hormona de crescimento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina, prorrelaxina; hormonas de glicoproteína tais como hormona estimulante de folículo (FSH), hormona estimulante da tiroide (TSH), e hormona luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogénio placentário; fator α e β de necrose de tumor; substância inibidora de mulleriano; péptido associado com gonadotropina de ratinho; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento neural tais como NGF- β ; fator de crescimento de plaqueta; fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento tipo insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão- α , - β , e - γ ; fatores de estimulação de colónia (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; um fator de necrose tumoral tal como TGF- α ou TNF- β ; e outros fatores de polipéptidos incluindo LIF e conjunto de ligandos (KL). Conforme usado no presente documento, o

termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de culturas de célula recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

O termo "pró-fármaco" conforme usado neste pedido refere-se a um precursor ou forma derivada de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para células tumorais se comparada com o fármaco parental e é capaz de ser enzimaticamente ou hidroliticamente ativada ou convertida na forma parental mais ativa. Veja-se, por exemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Os pró-fármacos desta invenção incluem, mas não se limitam a pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptido, pró-fármacos modificados por D-aminoácido, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo β -lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, pró-fármacos 5-fluorocitosina e outras 5-fluorouridinas que podem ser convertidos no fármaco livre mais citotóxico. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de pró-fármaco para utilização nesta invenção incluem, mas não se limitam àqueles agentes quimioterápicos descritos acima.

Um "lipossoma" é uma pequena vesícula composta de vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioativos que é útil para aplicação de um fármaco (tal como incluindo os anticorpos anti-CD30, CD40, CD70 ou Lewis Y e, opcionalmente, um agente quimioterápico) a um mamífero. Os componentes do lipossoma são comumente arranjados numa formação de bicamada, semelhante ao arranjo de lípido de

membranas biológicas. O termo "folheto informativo" é usado no presente documento para referir-se a instruções comumente incluídas nas embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informação sobre as indicações, utilização, dosagem, administração, contraindicação e/ou avisos relacionados com a utilização destes produtos terapêuticos.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está ordinariamente associada na fonte natural do ácido nucleico do anticorpo. Uma molécula de ácido nucleico isolada é diferente na forma ou forma de realização na qual é encontrada na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas, portanto, são distintas da molécula de ácido nucleico da maneira como existe nas células naturais. Entretanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que ordinariamente expressam o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está num local cromossômico diferente daquele nas células naturais.

A expressão "sequências de controle" refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operativamente ligada num organismo hospedeiro específico. As sequências de controle que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um local de ligação de ribossoma. Células eucarióticas são conhecidas por utilizar promotores, sinais de poliadenilação, e intensificadores.

Um ácido nucleico está "operativamente ligado" quando é colocado num relacionamento funcional com uma outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, ADN para uma pré-sequência ou líder secretor está operativamente ligado ao ADN para um polipéptido se ele for expresso como uma pré-

proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou intensificador é operativamente ligado a uma sequência de codificação se ele afeta a transcrição da sequência; ou um local de ligação de ribossoma está operativamente ligado a uma sequência de codificação se ele estiver posicionado de modo a facilitar a tradução. De forma geral, "operativamente ligado" significa que as sequências de ADN ligadas são contíguas, e, no caso de um líder secretor, contíguo e na fase de leitura. Entretanto, intensificadores não necessitam ser contíguos. A ligação pode ser obtida pela ligação em locais de restrição convenientes. Se estes locais não existirem, os adaptadores ou ligantes sintéticos de oligonucleótido podem ser usados de acordo com a prática convencional.

Conforme usado no presente documento, a expressão "célula", "linha celular", e "cultura de célula" são usadas de forma intercambiável e todas estas designações incluem progénie. Dessa maneira, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula objeto primária e culturas derivadas das mesmas sem consideração com o número de transferências. É também entendido que toda a progénie não precisa ser precisamente idêntica em teor de ADN, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. Progénies mutantes que têm a mesma função ou atividade biológica conforme explorado na célula originalmente transformada são incluídas. Onde existir a intenção de designações distintas, isto ficará claro em consequência do contexto.

Uma "doença autoimune" no presente documento é uma doença ou distúrbio resultante e direcionada contra os tecidos do próprio indivíduo ou um co-segregado ou manifestação das mesmas ou condição resultante das mesmas. Exemplos de doenças ou distúrbios autoimunes incluem, mas não se limitam a artrite (artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, artrite psoriática, e espondilite anquilosante), psoríase, dermatite, incluindo

dermatite atópica; urticária idiopática crónica, incluindo urticária autoimune crónica, polimiosite/dermatomiosite, necrólise epidérmica tóxica, esclerodermia e esclerose sistémicas, respostas associadas com doença inflamatória do intestino (IBD) (doença de Crohn, colite ulcerativa), e IBD com co-secregado de piodermatite gangrenosa, eritema nodoso, colangite esclerosante primária, e/ou episclerite), síndrome de dificuldade respiratória, incluindo síndrome de dificuldade respiratória do adulto (ARDS), meningite, doenças mediadas por IgE tais como anafilaxia e rinite alérgica, encefalite tal como encefalite de Rasmussen, uveíte, colite tal como colite microscópica e colite colagenosa, glomerulonefrite (GN) tal como GN membranosa, GN membranosa idiopática, GN proliferativa membranosa (MPGN), incluindo Tipo I e Tipo II, e GN rapidamente progressiva, condições alérgicas, eczema, asma, condições envolvendo infiltração de células T e respostas inflamatórias crónicas, aterosclerose, miocardite autoimune, deficiência de adesão de leucócito, lúpus eritematoso sistémico (SLE) tal como SLE cutâneo, lúpus (incluindo nefrite, cerebrite, pediátrica, não renal, discoide, alopecia), diabetes de início na juventude, esclerose múltipla (MS) tal como MS espino-ótica, encefalomielite alérgica, respostas imunes associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose incluindo granulomatose de Wegener, agranulocitose, vasculite (incluindo vasculite dos grandes vasos (incluindo polimialgia reumática e arterite de célula gigante (Takayasu)), vasculite dos vasos médios (incluindo doença de Kawasaki e poliarterite nodosa), vasculite do CNS, e vasculite associada com ANCA, tal como vasculite ou síndrome de Churg-Strauss (CSS)), anemia aplástica, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond-Blackfan, anemia hemolítica imune incluindo anemia hemolítica autoimune

(AIHA), anemia perniciosa, aplasia de hemácias puras (PRCA), deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças envolvendo diapedese de leucócito, distúrbios inflamatórias do CNS, síndrome de ferimento de múltiplos órgãos, miastenia gravis, doenças mediadas por complexo de antígeno-anticorpo, doença de membrana de base antiglomerular, síndrome de anticorpo de antifosfolípido, neurite alérgica, doença de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténica de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rejeição de transplante de órgão sólido (incluindo pré-tratamento para titulações de anticorpo reativo de alto painel, depósito IgA nos tecidos, e rejeição decorrente de transplante renal, transplante de fígado, transplante de intestino, transplante cardíaco, etc.), doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), penfigoide bolhosa, pênfigo (incluindo vulgar, foliáceo, e penfigoide da membrana mucosa do pênfigo, poliendocrinopatias autoimunes, doença de Reiter, síndrome do homem rígido, nefrite de complexo imune, polineuropatias de IgM ou neuropatia mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia (conforme desenvolvida por pacientes de enfarto de miocárdio, por exemplo), incluindo trombocitopenia autoimune, doença autoimune do testículo e ovário, incluindo orquite e ooforite autoimunes, hipotireoidismo primário; doenças endócrinas autoimunes incluindo tireoidite autoimune, tireoidite crónica (tireoidite de Hashimoto), tireoidite sub-aguda, hipotireoidismo idiopático, doença de Addison, doença de Grave, síndromes poliglandulares autoimunes (ou síndrome da endocrinopatia poliglandular), diabetes Tipo I também referida como diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), incluindo IDDM pediátrica, e síndrome de Sheehan; hepatite autoimune,

pneumonite intersticial linfoide (VIH), bronquiolite obliterante (não transplante) vs. NSIP, síndrome de Guillain-Barré, doença de Berger (nefropatia de IgA), cirrose biliar primária, doença celíaca (enteropatia de glúten), esprue refratário com dermatite herpetiforme co-segregada, crioglobulinemia, esclerose amiotrófica lateral (ALS; doença de Lou Gehrig), doença da artéria coronária, doença autoimune do ouvido interno (AIED), perda auditiva autoimune; síndrome de opsoclonus-mioclonus (OMS); policondrite tal como policondrite refratária, proteinose alveolar pulmonar, amiloidose, hepatite de célula gigante, esclerite, gamopatia monoclonal de significância incerta/desconhecida (MGUS), neuropatia periférica, síndrome paraneoplástica, doenças de canal tais como epilepsia, enxaqueca, arritmia, distúrbios musculares, surdez, cegueira, paralisia periódica, e doenças de canal do CNS; autismo, miopatia inflamatória, e glomerulosclerose focal segmentar (FSGS).

"Alquilo" é hidrocarboneto C_1-C_{18} contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cíclicos. Exemplos são metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$),

2,3-dimetil-2-butilo $(-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2)$, 3,3-dimetil-2-butilo $(-CH(CH_3)C(CH_3)_3)$.

"Alquenilo" é hidrocarboneto C_1-C_{18} contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cíclicos, com pelo menos um local de insaturação, isto é, um carbono-carbono, ligação dupla sp^2 . Exemplos incluem, mas não se limitam a: etileno ou vinilo $(-CH=CH_2)$, alilo $(-CH_2CH=CH_2)$, ciclopentenilo $(-C_5H_7)$, e 5-hexenilo $(-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2)$.

"Alquinilo" é hidrocarboneto C_2-C_{18} contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cíclicos, com pelo menos um local de insaturação, isto é, um carbono-carbono, ligação tripla sp . Exemplos incluem, mas não se limitam a: acetilénico $(-CH\equiv CH)$ e propargil $(-CH_2C\equiv CH)$.

"Alquilenos" refere-se a um radical de hidrocarboneto saturado, de cadeia ramificada ou linear ou cíclico de 1-18 átomos de carbono, e que tem dois centros de radical monovalente derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio dos mesmos ou dois átomos de carbono diferentes de um alceno parental. Radicais típicos de alquilenos incluem, mas não se limitam a: metileno $(-CH_2-)$, 1,2-etilo $(-CH_2CH_2-)$, 1,3-propilo $(-CH_2CH_2CH_2-)$, 1,4-butilo $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-)$, e semelhantes.

"Alquilenos" refere-se a um radical de hidrocarboneto saturado, de cadeia ramificada ou linear ou cíclico de 2-18 átomos de carbono, e que tem dois centros de radical monovalente derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio dos mesmos ou dois átomos de carbono diferentes de um alceno parental. Radicais típicos de alquilenos incluem, mas não se limitam a: 1,2-etileno $(-CH=CH-)$.

"Alquilenos" refere-se a um radical de hidrocarboneto saturado, de cadeia ramificada ou linear ou cíclico de 2-18 átomos de carbono, e que tem dois centros de radical monovalente derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio dos mesmos ou dois átomos de carbono diferentes de um alceno parental. Radicais típicos de alquilenos

incluem, mas não se limitam a: acetileno ($-C\equiv C-$), propargil ($-CH_2C\equiv C-$), e 4-pentiniilo ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$).

"Arilo" significa um radical hidrocarboneto monovalente aromático de 6-20 átomos de carbono derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio de um átomo de carbono único de um sistema de anel aromático parental. Alguns grupos arilo são representados nas estruturas exemplares como "Ar". Grupos arilo típicos incluem, mas não se limitam a radicais derivados de benzendo, benzeno substituído, naftaleno, antraceno, bifenilo, e semelhantes.

"Arilalquilo" refere-se a um radical alquilo acíclico no qual um dos átomos de hidrogénio ligados a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp^3 , é substituído por um radical arilo. Grupos arilalquilo típicos incluem, mas não se limitam a, benzilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobenzilo, 2-naftofeniletan-1-ilo e semelhantes. O grupo arilalquilo compreende 6 a 20 átomos de carbono, por exemplo, a fração alquilo, incluindo grupos alcanilo, alqueno ou alquino, do grupo arilalquilo é 1 a 6 átomos de carbono e a fração arilo é de 5 a 14 átomos de carbono. O grupo arilalquilo compreende de 6 a 20 átomos de carbono, por exemplo, a fração alquilo, incluindo grupos alcanilo, alqueno ou alquino, do grupo arilalquilo é de 1 a 6 átomos de carbono e a fração arilo é de 5 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" refere-se a um radical alquilo acíclico no qual um dos átomos de hidrogénio ligado a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp^3 , é substituído por um radical heteroarilo. Grupos heteroarilalquilo típicos incluem, mas não se limitam a, 2-benzimidazolilmetilo, 2-furiletano, e semelhantes. O grupo heteroarilalquilo compreende de 6 a 20 átomos de carbono, por exemplo, a fração alquilo, incluindo grupos alcanilo, alqueno ou alquino, do grupo heteroarilalquilo é de 1 a

6 átomos de carbono e a fração heteroarilo é de 5 a 14 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O, P, e S. A fração heteroarilo do grupo heteroarilalquilo pode ser um monociclo que tem de 3 a 7 membros do anel (2 a 6 átomos de carbono) ou um biciclo que tem de 7 a 10 membros de anel (4 a 9 átomos de carbono e de 1 a 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O, P, e S), por exemplo: um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], ou [6,6].

"Alquilo substituído", "arilo substituído", e "arilalquilo substituído" significa alquilo, arilo, e arilalquilo, respetivamente, nas quais um ou mais átomos de hidrogénio são cada um, independentemente, substituídos por um substituinte. Substituintes típicos incluem, mas não se limitam a: $-X$, $-R$, $-O^-$, $-OR$, $-SR$, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $NC(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$, $-C(=NR)NR_2$, onde cada X é, independentemente um halogénio: F, Cl, Br, ou I; e cada R é, independentemente, $-H$, alquilo C_2-C_{18} , arilo C_6-C_{20} , heterociclo C_3-C_{14} , grupo protetor ou fração pró-fármaco. Grupos alquilenos, alquenileno, e alquinileno conforme descritos acima podem também ser substituídos de maneira semelhante.

"Heteroarilo" e "Heterociclo" referem-se a um sistema de anel no qual um ou mais átomos do anel é um heteroátomo, por exemplo, nitrogénio, oxigénio, e enxofre. O radical heterociclo compreende de 1 a 20 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O, P, e S. Um heterociclo pode ser um monociclo que tem de 3 a 7 membros de anel (2 a 6 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O, P, e S) ou um biciclo que tem de 7 a 10 membros de anel (4 a 9 átomos de carbono e 1

a 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O, P, e S), por exemplo: um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], ou [6,6].

Heterociclos são descritos por Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nova York, 1968), especificamente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, e 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nova York, 1950 até o presente), em especial os volumes 13, 14, 16, 19 e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Exemplos de heterociclos incluem como exemplo e não como limitação, piridilo, diidropiridilo, tetraidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetraidrotiofenilo, tetraidrotiofenilo oxidado com enxofre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetraidrofuranilo, bis-tetraidrofuranilo, tetraidropiranilo, bis-tetraidropiranilo, tetraidroquinolinilo, tetraidroisoquinolinilo, decaidroquinolinilo, octaidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo,

quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzissoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoilo.

Como exemplo e não como limitação, heterociclos ligados a carbono são ligados na posição 2, 3, 4, 5, ou 6 de uma piridina, posição 3, 4, 5, ou 6 de uma piridazina, posição 2, 4, 5, ou 6 de uma pirimidina, posição 2, 3, 5, ou 6 de uma pirazina, posição 2, 3, 4, ou 5 de um furano, tetraidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol ou tetraidropirrol, posição 2, 4, ou 5 de um oxazol, imidazol ou tiazol, posição 3, 4, ou 5 de um isoxazol, pirazol, ou isotiazol, posição 2 ou 3 de uma aziridina, posição 2, 3, ou 4 de uma azetidina, posição 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma quinolina ou posição 1, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma isoquinolina. Ainda mais tipicamente, heterociclos ligados por carbono incluem 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, ou 5-tiazolilo.

Como exemplo e não como limitação, heterociclos ligados por nitrogénio são ligados na posição 1 de uma aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posição 2 de um isoindol, ou isoindolina, posição 4 de uma morfolina, e posição 9 de um carbazol, ou β -carbolina. Ainda mais tipicamente, heterociclos ligados por nitrogénio incluem 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, e 1-piperidinilo.

"Carbociclo" significa um anel saturado ou insaturado que tem 3 a 7 átomos de carbono como um monociclo ou 7 a 12 átomos de carbono como um biciclo. Carbociclos monocíclicos

têm 3 a 6 átomos no anel, ainda mais tipicamente 5 ou 6 átomos no anel. Carbociclos bicíclicos têm 7 a 12 átomos no anel, por exemplo, arrançados como um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6], ou 9 ou 10 átomos no anel arrançados como um sistema biciclo [5,6] ou [6,6]. Exemplos de carbociclos monocíclicos incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, cicloexilo, 1-cicloex-1-enilo, 1-cicloex-2-enilo, 1-cicloex-3-enilo, cicloeptilo, e ciclooctilo.

"Ligante" "Unidade de Ligante", ou "ligação" significa uma fração química que compreende uma ligação covalente ou uma cadeia de átomos que covalentemente anexam um anticorpo a uma fração de fármaco. Em várias formas de realização, um ligante é especificado como LU, Ligantes incluem um radical bivalente tal como uma alquildiilo, uma arildiilo, um heteroarildiilo, porções tais como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por exemplo, polietilenoxi, PEG, "polimetilenoxi) e alquilamino (por exemplo, polietilenoamino, Jeffamine™); e éster diácido e amidas incluindo succinato, succinamida, diglicolato, malonato, e caproamida.

O termo "quiral" refere-se a moléculas que têm a propriedade de não sobreposição do parceiro de imagem refletida, enquanto o termo "aquiral" refere-se a moléculas que são sobrepostas ao seu parceiro de imagem refletida.

O termo "estereoisómeros" refere-se a compostos que têm constituição química idêntica, mas diferem com relação ao arranjo dos átomos ou grupos no espaço.

"Diastereómero" refere-se a um estereoisómero com dois ou mais centros de quiralidade e aquelas moléculas não são imagens refletidas uma da outra. Diasterómeros possuem propriedades físicas diferentes, por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, propriedades espectrais, e reatividades. Misturas de diasterómeros podem ser separadas

sob procedimentos analíticos de alta resolução, tais como eletroforese e cromatografia.

"Enantiómeros" referem-se a dois estereoisómeros de um composto que não são imagens refletidas sobrepostas um do outro.

Definições e convenções de estereoquímica usadas no presente documento geralmente seguem S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nova York; e Eliel, E. e Wilen, s., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nova York. Muitos compostos orgânicos existem nas formas opticamente ativas, isto é, eles têm a capacidade para girar o plano de luz polarizada por plano. Na descrição de um composto opticamente ativo, os prefixos D e L, ou R e S, são usados para denotar a forma de realização absoluta da molécula sobre o(s) seu(s) centro(s) quiral(is). Os prefixos d e l ou (+) e (-) são utilizados para designar o sinal de rotação de luz polarizada por plano pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levogiro. Um composto prefixado com (+) ou d é dextrogiro. Para uma estrutura química dada, estes estereoisómeros são idênticos, exceto pelo facto de que são imagens refletidas um do outro. Um estereoisómero específico pode também ser referido como um enantiómero, e uma mistura destes isómeros é frequentemente denominada de mistura enantiomérica. Uma mistura 50:50 de enantiómeros é referida como uma mistura racémica ou um racemato, que pode ocorrer onde não houver ocorrido estereosseleção ou estereoespecificidade numa reação ou processo químico. Os termos "mistura racémica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, isentas de atividade ótica.

Exemplos de um "paciente" incluem, mas não se limitam a, um ser humano, rato, ratinho, cobaia, macaco, porco, vaca, cavalo, cão, gato, pássaro e aves. Numa forma de

realização exemplar, o paciente é um ser humano.

"Arilo" refere-se a um grupo carbocíclico aromático. Exemplos de grupos arilo incluem, mas não se limitam a fenilo, naftilo e antracenilo. Um grupo carbocíclico aromático ou um grupo heterocíclico aromático pode ser não substituído ou substituído com um ou mais grupos incluindo, mas não limitado a: alquilo C_1-C_8 , $-O-(\text{alquilo } C_1-C_8)$, $-arilo$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-halogénio$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

O termo "alquilo C_1-C_8 ", conforme usado no presente documento, refere-se a um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada, saturado ou insaturado que tem de 1 a 8 átomos de carbono. Grupos "alquilo C_1-C_8 " representativos incluem, mas não se limitam a $-metilo$, $-etilo$, $-n-propilo$, $-n-butilo$, $-n-pentilo$, $-n-hexilo$, $-n-heptilo$, $-n-octilo$, $-n-nonilo$ e $-n-decilo$; enquanto alquilos C_1-C_8 ramificados incluem, mas não se limitam a $-isopropilo$, $-sec-butilo$, $-isobutilo$, $-terc-butil$, $-isopentilo$, $2-metilbutilo$, alquilos C_1-C_8 insaturadas incluem mas não se limitam a, $-vinilo$, $-alilo$, $-1-butenilo$, $-2-butenilo$, $-isobutilenilo$, $-1-pentenilo$, $-2-pentenilo$, $-3-metil-1-butenilo$, $-2-metil-2-butenilo$, $-2,3-dimetil-2-butenilo$, $1-hexilo$, $2-hexilo$, $3-hexilo$, $-acetilenilo$, $-propinilo$, $-1-butinilo$, $-2-butinilo$, $-1-pentinilo$, $-2-pentinilo$, $-3-metil-1-butinilo$, $metilo$, $etilo$, $propilo$, $isopropilo$, $n-butilo$, $isobutilo$, $sec-butilo$, $terc-butilo$, $n-pentilo$, $isopentilo$, $neopentilo$, $n-hexilo$, $isoexilo$, $2-metilpentilo$, $3-metilpentilo$, $2,2-dimetilbutilo$, $2,3-dimetilbutilo$, $2,2-dimetilpentilo$, $2,3-dimetilpentilo$, $3,3-dimetilpentilo$, $2,3,4-trimetilpentilo$, $3-metilexilo$, $2,2-dimetilexilo$, $2,4-dimetilexilo$, $2,5-dimetilexilo$, $3,5-dimetilexilo$, $2,4-dimetilpentilo$, $2-metileptilo$, $3-metileptilo$, $n-heptilo$, $isoeptilo$, $n-octilo$,

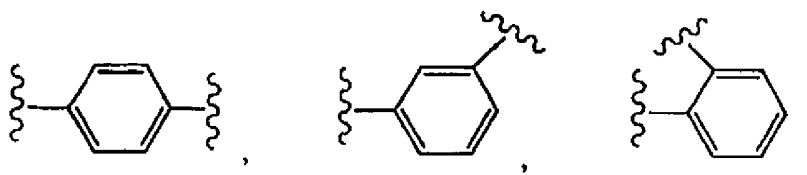
e isooctilo. Um grupo alquilo C_1-C_8 pode ser não substituído ou substituído com um ou mais grupos incluindo, mas não limitado a -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -halogénio, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

Um "carbociclo C_3-C_8 " é um anel carbocíclico saturado ou insaturado não aromático de 3-, 4-, 5-, 6-, 7- ou 8 membros. Carbociclos C_3-C_8 representativos incluem, mas não se limitam a -ciclopropilo, -ciclobutilo, ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -cicloexilo, -cicloexenilo, -1,3-cicloexadienilo, -1,4-cicloexadienilo, cicloeptilo, -1,3-cicloeptadienilo, -1,3,5-cicloeptatrienilo, -ciclooctilo, e -ciclooctadienilo. Um grupo carbociclo C_3-C_8 pode ser não substituído ou substituído por um ou mais grupos incluindo, mas não limitados a -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -halogénio, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

Um "carbociclo C_3-C_8 " refere-se a um grupo carbociclo C_3-C_8 definido acima onde um dos átomos de hidrogénio dos grupos carbociclos é substituído com uma ligação.

Um "alquileno C_1-C_{10} " é um grupo hidrocarboneto de cadeia linear, saturado com a fórmula $-(CH_2)_{1-10}-$. Exemplos de um alquileno C_1-C_{10} incluem metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno e decaleno.

Um "arileno" é um grupo arilo que tem duas ligações covalentes e pode estar nas formas de realização orto, meta ou para, conforme mostrado nas estruturas a seguir:



nas quais o grupo fenilo pode ser não substituído ou substituído com até quatro grupos incluindo, mas não limitado a -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogénio, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

Um "heterociclo C_3-C_8 " refere-se a um carbociclo C_3-C_8 aromático ou não aromático no qual de um a quatro dos átomos de carbono do anel são independentemente substituídos com um heteroátomo do grupo consistindo de O, S e N. Exemplos representativos de um heterociclo C_3-C_8 incluem, mas não se limitam a benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, e tetrazolilo. Um heterociclo C_3-C_8 pode ser não substituído ou substituído com até sete grupos incluindo, mas não limitados a -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogénio, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

Um "heterociclo C_3-C_8 " refere-se a um grupo heterociclo C_3-C_8 definido acima, onde um dos átomos de hidrogénio do grupo heterociclo é substituído por uma ligação. Um heterociclo C_3-C_8 pode ser não substituído ou substituído por até seis grupos incluindo, mas não

limitados a -alquilo C_1-C_8 , - O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, - $C(O)R'$, - $OC(O)R'$, - $C(O)OR'$, - $C(O)NH_2$, - $C(O)NHR'$, - $C(O)N(R')_2$, - $NHC(O)R'$, - $S(O)_2R'$, - $S(O)R'$, -OH, -halogénio, - N_3 , - NH_2 , - $NH(R')$, - $N(R')_2$ e -CN; onde cada R' é independentemente selecionado a partir de H, alquilo C_1-C_8 , e arilo.

Um "Composto Exemplar" é um Composto de Fármaco ou um Composto de Fármaco-Ligante.

Um "Conjugado Exemplar" é um Conjugado de Fármaco-Ligando que tem uma unidade de Fármaco clivável do Conjugado de Fármaco-Ligando ou um Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando.

Em algumas formas de realização os Compostos Exemplares e Conjugados Exemplares estão na forma isolada ou purificada. Conforme usado no presente documento, "isolado" significa separado de outros componentes de (a) uma fonte natural, tal como uma célula vegetal ou animal ou cultura de célula, ou (b) uma mistura de reação química orgânica sintética. Conforme usado no presente documento "purificado" significa que, quando isolado, o isolado contém pelo menos 95 %, e num outro aspeto pelo menos 98 %, de Composto Exemplar ou Conjugado Exemplar em peso do isolado.

Exemplos de um "grupo de proteção de hidroxilo" incluem, mas não se limitam a metoximetiléter, 2-metoxietoximetiléter, tetraidropiranyléter, benziléter, p-metoxibenziléter, trimetilsililéter, trietilsililéter, triisopropilsililéter, t-butildimetilsililéter, trifenildimetilsililéter, éster de acetato, ésteres de acetato substituídos, pivaloato, benzoato, metanossulfonato e p-toluenossulfonato.

"Grupo abandonante" refere-se a um grupo funcional que pode ser substituído por um outro grupo funcional. Estes grupos abandonantes são bem conhecidos na técnica, e exemplos incluem, mas não se limitam a haleto (por exemplo,

cloreto, brometo, iodeto), metano sulfonilo (mesilo), p-tolueno sulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), e trifluorometilsulfonato.

A frase "sal farmacêuticamente aceitável", conforme usada no presente documento, refere-se a sais orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis de um Composto Exemplar ou Conjugado Exemplar. Os Compostos Exemplares e Conjugados Exemplares contêm pelo menos um grupo amino, e consequentemente sais de adição ácidos podem ser formados com este grupo amino. Sais exemplares incluem, mas não se limitam a sais de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato, e pamoato (isto é, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxí-3-naftoato)). Um sal farmacêuticamente aceitável pode envolver a inclusão de uma outra molécula tal como um ião de acetato, um ião de succinato ou outros contra-íões. O contra-íão pode ser qualquer fração orgânica ou inorgânica que estabiliza a carga do composto parental. Além do mais, um sal farmacêuticamente aceitável pode ter mais que um átomo carregado na sua estrutura. Casos onde átomos de carga múltipla são parte do sal farmacêuticamente aceitável podem ter contra-íões múltiplos. Assim, um sal farmacêuticamente aceitável pode ter um ou mais átomos carregados e/ou um ou mais contra-íões.

"Solvato farmacêuticamente aceitável" ou "solvato" refere-se a uma associação de uma ou mais moléculas de solvente e um composto da invenção, por exemplo, um Composto Exemplar ou Conjugado Exemplar. Exemplos de solvente que formam solvatos farmacêuticamente aceitáveis

incluem, mas não se limitam a água, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, e etanolamina.

As abreviações a seguir são usadas no presente documento e possuem as definições indicadas: AE é auristatina E, Boc é N-(t-butoxicarbonil), cit é citrulina, dap é dolaproína, DCC é 1,3-dicicloexilcarbodiimida, DCM é diclorometano, DEA é dietilamina, DEAD é dietilazodicarboxilato, DEPC é dietilfosforilcianidato, DIAD é diisopropilazodicarboxilato, DIEA é N,N-diisopropiletilamina, dil é dolaisoleuina (SIC), DMAP é 4-dimetilaminopiridina, DME é éter dimetílico de etilenoglicol (ou 1,2-dimetoxietano), DMF é N,N-dimetilformamida, DMSO é dimetilsulfóxido, doe é dolafenina, dov é N,N-dimetilvalina, DTNB é 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA é ácido dietilenotriaminapentaacético, DTT é ditiotreitól, EDCI é cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3- etilcarbodiimida, EEDQ é 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-diidroquinolina, ES-MS é espectrometria de massa de eletropulverização, EtOAc é acetato de etilo, Fmoc é N-(9-fluorenilmetoxicarbonil), gly é glicina, HATU é O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio hexafluorofosfato, HOBT é 1-hidroxibenzotriazol, HPLC é cromatografia líquida de alta pressão, ile é isoleucina, lys é lisina, MeCN (CH₃CN) é acetonitrilo, MeOH é metanol, Mtr é 4-anisildifenilmetilo (ou 4-metoxitritilo), nor é (1S,2R)-(+)-norefedrina, PAB é p-aminobenzilo, PBS é fosfato-solução salina tamponada (pH 7,4), PEG é polietilenoglicol, Ph é fenilo, Pnp é p-nitrofenilo, MC é 6-maleimidocaproilo, phe é L-fenilalanina, PyBrop é bromo tris-pirrolidino fosfônio hexafluorofosfato, SEC é cromatografia de exclusão de tamanho, Su é succinimida, TBTU é O-benzotriazol-1-il-N,N,N,N'-tetrametilurônio tetrafluoroborato, TFA é ácido trifluoroacético, TLC é cromatografia de camada fina, UV é

ultravioleta, e val é valina.

As abreviações de ligante a seguir são usadas no presente documento e têm as definições indicadas: Val Cit é valina-citrulina, local do dipéptido no ligante clivável por protease; PAB é p-aminobenzilcarbamoil; (Me)vc é N-metil-valina citrulina, onde a ligação peptídica do ligante foi modificada para impedir sua clivagem por catepsina B; MC(PEG)6-OH é maleimidocaproil-poli(etilenoglicol); SPP é 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo; e SMCC é 4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato de N-succinimidilo.

Os termos "tratar" ou "tratamento", a não ser que indicado o contrário pelo contexto, referem-se a tratamento terapêutico e profilático ou medidas preventivas, onde o objetivo é impedir ou tornar mais lento (diminuir) uma alteração fisiológica ou distúrbio indesejado, tal como o desenvolvimento ou disseminação de cancro. Para os objetivos desta invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se limitam a alívio de sintomas, diminuição da extensão da doença, estado estabilizado (isto é, não agravamento) da doença, atraso ou abrandamento da progressão da doença, melhora ou mitigação do estado da doença, e remissão (quer parcial ou total), quer detetável ou indetetável. "Tratamento" pode também significar prolongamento da sobrevivência se comparado com a sobrevivência esperada se não estivesse recebendo tratamento. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles que já apresentam a condição ou distúrbio, assim como aqueles propensos a desenvolver a condição ou distúrbio ou aqueles nos quais a condição ou distúrbio deve ser prevenida.

No contexto de cancro, o termo "tratamento" inclui qualquer ou todos dentre: impedir o crescimento de células tumorais, células cancerígenas, ou de um tumor; impedir a replicação de células tumorais ou células cancerígenas, diminuir a carga geral do tumor ou diminuir o número de

células cancerígenas, e melhorar um ou mais sintomas associados a a doença.

No contexto de uma doença autoimune, o termo "tratamento" inclui qualquer um ou todos dentre: impedir a replicação de células associadas com um estado de doença autoimune incluindo, mas não limitado a células que produzem um anticorpo autoimune, diminuição da carga de anticorpo autoimune e melhoria de um ou mais sintomas de uma doença autoimune.

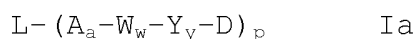
No contexto de uma doença infecciosa, o termo "tratamento" inclui qualquer um ou todos dentre: impedir o crescimento, multiplicação ou replicação do patógeno que causa a doença infecciosa e melhorar um ou mais sintomas de uma doença infecciosa.

As abreviações a seguir de fármacos citotóxicos são usadas no presente documento e têm as definições indicadas: MMAE é monometil auristatina E (MW 718); MMAF é N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (MW 731,5); MMAF-DMEA é MMAF com DMAEA (dimetilaminoetilamina) numa ligação de amida à fenilalanina do terminal C (MW 801,5); MMAF-TEG é MMAF com tetraetilenoglicol esterificado à fenilalanina; MMAF-NtBu é N-t-butilo, unido como uma amida ao terminal C de MMAF; AEVB é auristatina E valeril benzilidrazona, ligante de ácido instável através do terminal C de AE (MW 732); e AFP é monoamida de p-fenileno diamina com fenilalanina de terminal C de auristatina F (MW 732).

4.2 COMPOSTOS

4.2.1 OS COMPOSTOS DE FÓRMULA (Ia)

São descritos no presente documento Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando que tem a Fórmula Ia:



ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo em que,

L- é uma unidade de Ligando;

$-A_a-W_w-Y_y-$ é uma unidade de Ligante (LU), em que a unidade de Ligante inclui:

$-A-$ é uma unidade de Estirador,

a é 0 ou 1,

cada $-W-$ é independentemente uma unidade de Aminoácido,

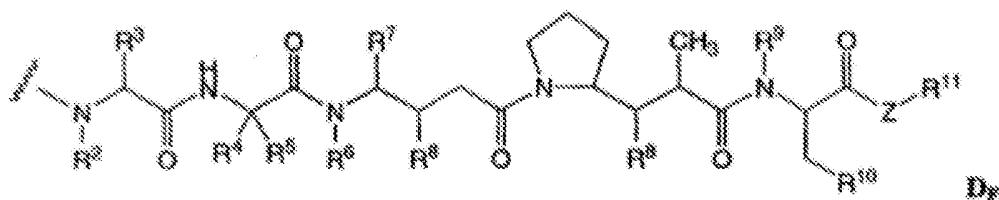
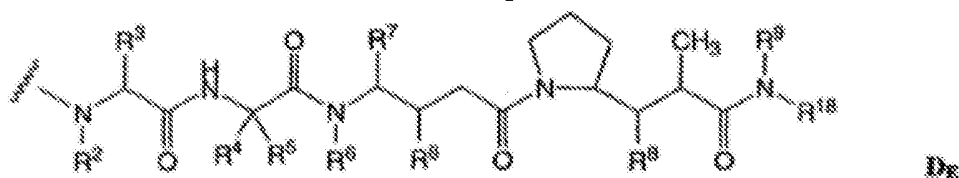
w é um número inteiro que varia de 0 a 12,

$-Y-$ é uma unidade de Espaçador, e

y é 0, 1 ou 2;

p varia de 1 a cerca de 20; e

$-D$ é uma unidade de Fármaco que tem a fórmula D_E e D_F :



em que, independentemente em cada localização:

R^2 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^3 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 é selecionado de H e metilo;

ou R^4 e R^5 juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C_1-C_8 e carbociclo C_3-C_8 e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de arilo ou heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH, ou NR^{12} , em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

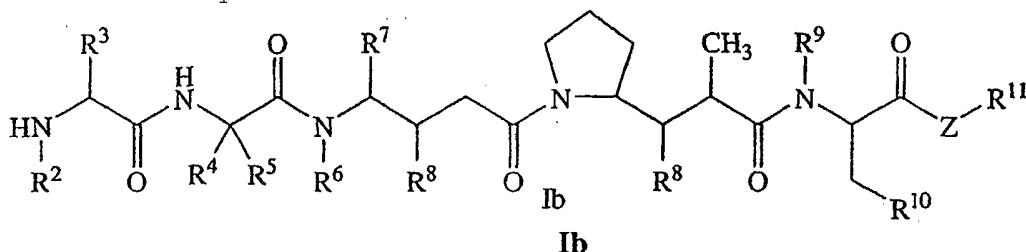
cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} é selecionado de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), e $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8);

e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Também são descritos no presente documento Compostos de Fármaco que têm a fórmula Ib:



ou sais ou solvatos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, em que:

R^2 é selecionado de hidrogénio e -alquilo C_1-C_8 ;

R^3 é selecionado de hidrogénio, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo

C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e -alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 é selecionado de hidrogénio, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e -alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8) em que R^5 é selecionado de -H e metilo; ou R^4 e R^5 juntamente têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente selecionados de -H, -alquilo C_1-C_8 e -carbociclo C_3-C_8 e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6, e formam um anel com o átomo de carbono ao qual estão unidos;

R^6 é selecionado de H e -alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, -OH, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 e -O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e -alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de grupo arilo ou -heterociclo C_3-C_8 ;

Z é -O-, -S-, -NH-, ou $-NR^{12}-$, em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, -heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R^{13} é -alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, $-COOH$, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, -alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$; e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Também são descritos Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando que têm a fórmula Ia':



ou sais ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos

mesmos,

em que

Ab é um anticorpo,

A é uma unidade de Estirador,

A é 0 ou 1,

Cada W é independentemente uma unidade de Aminoácido,

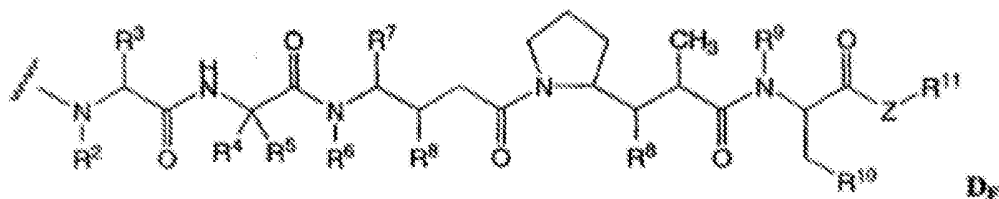
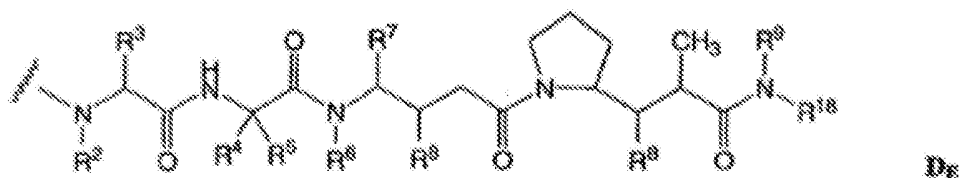
w é um número inteiro variando de 0 a 12,

Y é uma unidade de Espaçador, e

y é 0, 1 ou 2,

p varia de 1 a cerca de 20, e

D é uma fração de Fármaco selecionada a partir das Fórmulas D_E e D_F:



em que, independentemente em cada localização:

R² é selecionado de H e alquilo C₁-C₈;

R³ é selecionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ e alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ é selecionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ e alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ é selecionado de H e metilo;

ou R⁴ e R⁵ juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula -(CR^aR^b)_n- em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C₁-C₈ e carbociclo C₃-C₈ e n é

selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de arilo ou heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH, ou NR^{12} , em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} é selecionado de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), e $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8);

e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Ab é qualquer anticorpo covalentemente unido a uma ou mais unidades de fármaco. Ab inclui um anticorpo que se liga a CD30, CD40, CD70, antígeno Lewis Y. Numa outra forma de realização, Ab não inclui um anticorpo que se liga a um recetor ErbB ou a um ou mais dos recetores

(1) - (35):

(1) BMPR1B (recetor de proteína morfogenética óssea do tipo IB, N° de acesso do Genbank NM_001203);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acesso do Genbank NM_003486);

(3) STEAP1 (seis antígenios transmembranares

epiteliais da próstata, N° de acesso do Genbank NM_012449);

(4) 0772P (CA125, MUC₁₆, N° de acesso do Genbank AF361486);

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, fator de potencialização de megacariócito, mesotelina, N° de acesso do Genbank NM_005823);

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC₃₄A2, família do veículo de soluto 34 (fosfato de sódio), membro 2, portador de fosfato dependente de sódio do tipo II 3b, N° de acesso do Genbank NM_006424)

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, domínio sema, sete repetições de tromboespondina (tipo 1 e semelhante ao tipo 1), domínio de transmembrana (TM) e domínio citoplasmático curto, (semaforina) 5B, N° de acesso do Genbank AB040878);

(8) PSCA hlg (gene de 2700050C₁₂Rik, C₅₃0008016Rik, ADNc de RIKEN 2700050C₁₂, ADNc de RIKEN 2700050C₁₂, N° de acesso do Genbank AY358628);

(9) ETBR (recetor endotelina tipo B, N° de acesso do Genbank AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acesso do Genbank NM_017763);

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gene 1 associado com cancro da próstata, proteína 1 associada com cancro da próstata, seis antigénios de transmembrana epitelial de próstata 2, seis proteínas de transmembrana da próstata, N° de acesso do Genbank AF455138);

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catião potencial de recetor transiente, subfamília M, membro 4, N° de acesso do Genbank NM_017636);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, fator de crescimento derivado de teratocarcinoma, N° de acesso do

Genbank NP_003203 ou NM_003212);

(14) CD21 (CR2 (recetor de complemento 2) ou C₃DR (recetor de vírus C₃d/Epstein Barr) ou Hs.73792, N° de acesso do Genbank M26004);

(15) CD79b (IGb (beta imunoglobulina-associada), B29, N° de acesso do Genbank NM_000626);

(16) FcRH2, (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (domínio SH2 contendo proteína âncora de fosfatase 1a), SPAP1B, SPAP1C, N° de acesso do Genbank NM_030764);

(17) HER2 (N° de acesso do Genbank M11730);

(18) NCA (N° de acesso do Genbank M18728);

(19) MDP (N° de acesso do Genbank BC₀₁7023);

(20) IL20Ra (N° de acesso do Genbank AF184971);

(21) Brevican (N° de acesso do Genbank AF229053);

(22) Ephb2R (N° de acesso do Genbank NM_004442);

(23) ASLG659 (N° de acesso do Genbank AX092328);

(24) PSCA (N° de acesso do Genbank AJ297436);

(25) GEDA (N° de acesso do Genbank AY260763);

(26) BAFF-R (N° de acesso do Genbank NP_443177.1);

(27) CD22 (N° de acesso do Genbank NP_001762.1);

(28) CD79a (CD79A, CD79a, alfa imunoglobulina-associada, uma proteína específica de célula B que interage covalentemente com Ig beta (CD79B) e forma um complexo na superfície com molécula de IgM, faz a transdução de um sinal envolvido na diferenciação de célula B, N° de acesso do Genbank NP_001774.1);

(29) CXCR5 (recetor 1 de linfoma de Burkitt, um recetor acoplado a proteína G que é ativado pela quimiocina CXCL13, funciona na migração de linfócito e defesa humoral, possui um papel na infeção por VIH-2 e talvez no desenvolvimento de SIDA, linfoma, mieloma, e leucemia, N° de acesso do Genbank NP_001707.1);

(30) HLA-DOB (subunidade beta de molécula MHC classe II (antigénio Ia) que se liga a péptidos e os apresenta aos límfócitos CD4+ T, N° de acesso do Genbank

NP_002111.1);

(31) P2X5 (canal de ião de ligando fechado P2X de recetor purinérgico, um ião de canal fechado por ATP extracelular, pode estar envolvido na transmissão sináptica e neurogénese, deficiência pode contribuir para a fisiopatologia de instabilidade de detrusor idiopático, N° de acesso do Genbank NP_002552.2);

(32) CD72 (antigénio de diferenciação de célula B CD72, Lyb-2, N° de acesso do Genbank NP_001773.1);

(33) LY64 (antigénio de linfócito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I da família de repetição rica de leucina (LRR), regula a ativação de célula B e apoptose, perda de função está associada com atividade aumentada de doença em pacientes com eritematose de lúpus sistémico, N° de acesso do Genbank NP_005573.1);

(34) FCRH1 (proteína 1 tipo recetor Fc, um recetor putativo para o domínio de imunoglobulina Fc que contém domínios C₂ tipo semelhante a Ig e ITAM, pode ter um papel na diferenciação de linfócito B, N° de acesso do Genbank NP_443170.1); ou

(35) IRTA2 (translocação de recetor da superfamília imunoglobulina associada 2, um imunorrecetor putativo com possíveis papéis no desenvolvimento da célula B e linfomagénesse; desregulação do gene pela translocação ocorre em algumas malignidades de célula B, N° de acesso do Genbank NP_112571.1).

Numa forma de realização, -Ww- é -Val-Cit-. R³, R⁴ e R⁷ podem ser independentemente isopropilo ou sec-butilo e R⁵ é -H. Numa forma de realização exemplar, R³ e R⁴ são cada um isopropilo, R⁵ é -H, e R⁷ é sec-butilo. Em ainda uma outra forma de realização, R² e R⁶ são cada um metilo, e R⁹ é -H.

Ainda noutro exemplo, cada ocorrência de R⁸ é -OCH₃.

Num exemplo, R³ e R⁴ são, cada um, isopropilo, R² e R⁶ são, cada um, metilo, R⁵ é -H, R⁷ é sec-butilo, cada ocorrência de R⁸ é -OCH₃, e R⁹ é -H.

Num exemplo, z é $-O-$ ou $-NH-$.

Num exemplo, R^{10} é arilo.

Num exemplo particular, R^{10} é $-fenilo$.

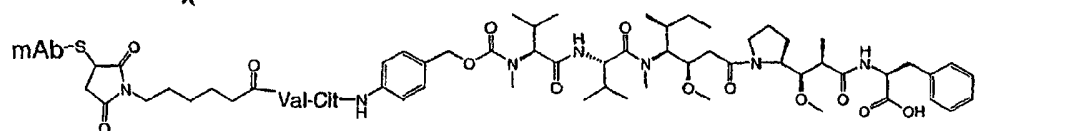
Num exemplo particular, quando Z é $-O-$, R^{11} é $-H$, metilo ou t -butilo.

Num exemplo, quando Z é $-NH$, R^{11} é $-CH(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, e R^{16} é $-alquilo\ C_1-C_8$ ou $-(CH_2)_n-COOH$.

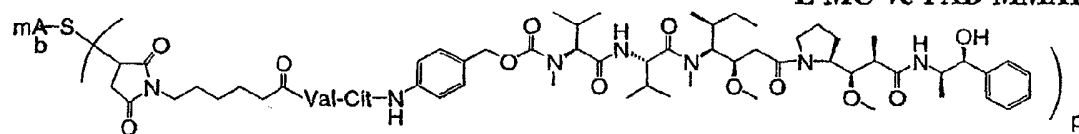
Noutro exemplo, quando Z é $-NH$, R^{11} é $-CH(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(CH_2)_n-SO_3H$.

Ab pode ser cAC10, cBR96, cS2C6, c1F6, c2F2, hAC10, hBR96, hS2C6, h1F6, e h2F2.

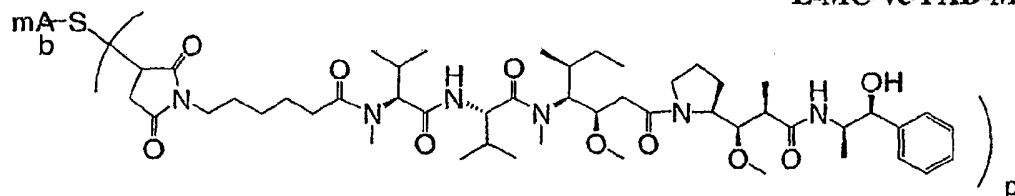
Conjugados de Fórmula **Ia** exemplares têm as seguintes estruturas:



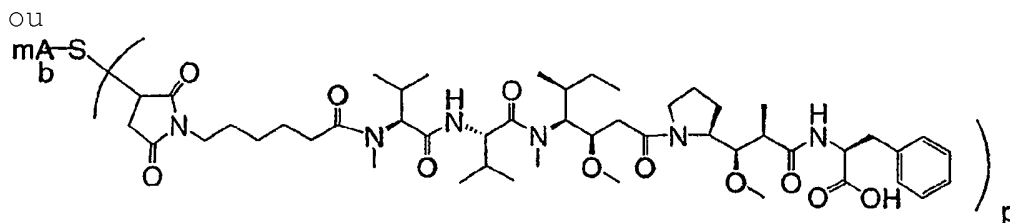
L-MC-vc-PAB-MMAF



L-MC-vc-PAB-MMAE



L-MC-MMAE



L-MC-MMAF

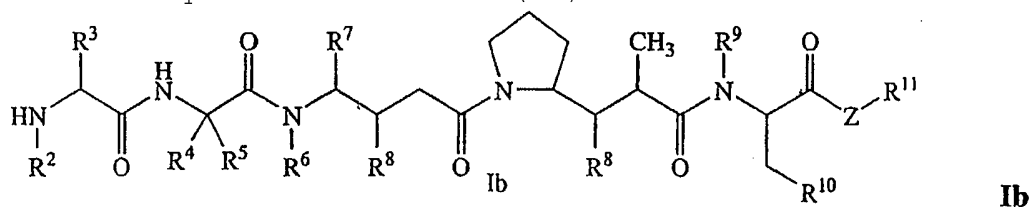
em que L é um anticorpo, Val é valina, e Cit é citrulina.

A carga do fármaco é representada por p , o número médio de moléculas de fármaco por anticorpo numa molécula

(por exemplo, de Fórmula Ia, Ia' e Ic). A carga do fármaco pode variar de 1 a 20 fármacos (D) por Ligando (por exemplo Ab ou mAb). Composições de Fórmula Ia e Fórmula Ia' incluem coleções de anticorpos conjugados com uma variedade de fármacos, de 1 a 20. O número médio de fármacos por anticorpo na preparação de reações de conjugação pode ser caracterizado por meios convencionais tais como espectroscopia de massa, análise ELISA, e HPLC. A distribuição quantitativa de Conjugados de Ligando-Fármaco em termos de p pode também ser determinada. Em alguns casos, separação, purificação, e caracterização de conjugados de Ligando-Fármaco homogêneos onde p é certo valor de Conjugados de Ligando-Fármaco com outras cargas de fármaco podem ser atingidas por meios tais como HPLC de fase reversa ou eletroforese.

4.2.2 OS COMPOSTOS DE FÁRMACO DE FÓRMULA (Ib)

Também são descritos no presente documento Compostos de Fármaco que têm a Fórmula (Ib):



ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

R^2 é selecionado de hidrogénio e -alquilo C_1-C_8 ;

R^3 é selecionado de hidrogénio, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e -alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 é selecionado de hidrogénio, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e -alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8) em que R^5 é selecionado de -H e metilo; ou R^4 e R^5 juntamente têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente selecionados de -H, -

alquilo C_1-C_8 e -carbociclo C_3-C_8 e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6, e formam um anel com o átomo de carbono ao qual estão unidos;

R^6 é selecionado de -H e -alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de -H, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilo C_1-C_8 -arilo, -alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de -H, -OH, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 e -O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de -H e -alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de grupo arilo ou -heterociclo C_3-C_8 ;

Z é -O-, -S-, -NH-, ou -NR¹²-, em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de -H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, -heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R^{13} é -alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é -H ou -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente -H, -COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente -H, -alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$; e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Num exemplo, R^3 , R^4 e R^7 são independentemente isopropilo ou sec-butilo e R^5 é -H. Num exemplo, R^3 e R^4 são, cada um, isopropilo, R^5 é -H, e R^7 é sec-butilo.

Noutro exemplo, R^2 e R^6 são, cada um, metilo, e R^9 é -H.

Ainda noutro exemplo, cada ocorrência de R^8 é -OCH₃. Num exemplo, R^3 e R^4 são, cada um, isopropilo, R^2 e R^6 são, cada um, metilo, R^5 é -H, R^7 é sec-butilo, cada ocorrência de R^8 é -OCH₃, e R^9 é -H.

Num exemplo, Z é -O- ou -NH-.

Num exemplo, R^{10} é arilo

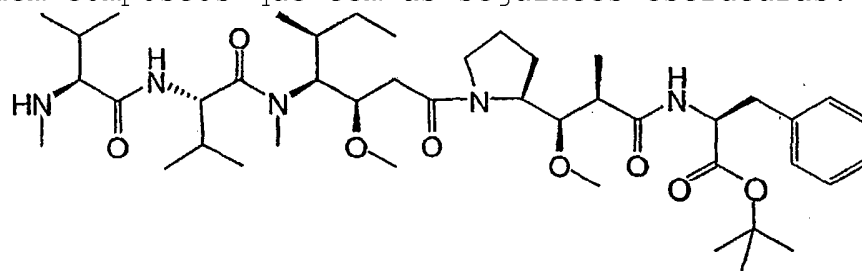
Num exemplo, R^{10} é -fenilo. Num exemplo, quando Z é -

O-, R^{11} é -H, metilo ou t-butilo.

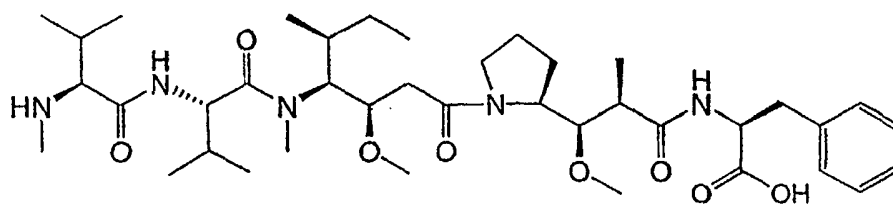
Num exemplo, quando Z é -NH, R^{11} é $-\text{CH}(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(R^{16})_2$, e R^{16} é -alquilo C_1-C_8 ou $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$.

Noutro exemplo, quando Z é -NH, R^{11} é $-\text{CH}(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(\text{CH}_2)_n-\text{SO}_3\text{H}$.

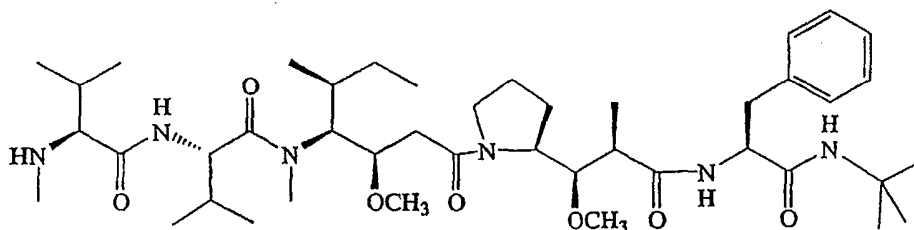
Compostos ilustrativos de Fórmula (Ib), cada um dos quais pode ser usado como frações de fármaco (D) em ADC, incluem compostos que têm as seguintes estruturas:



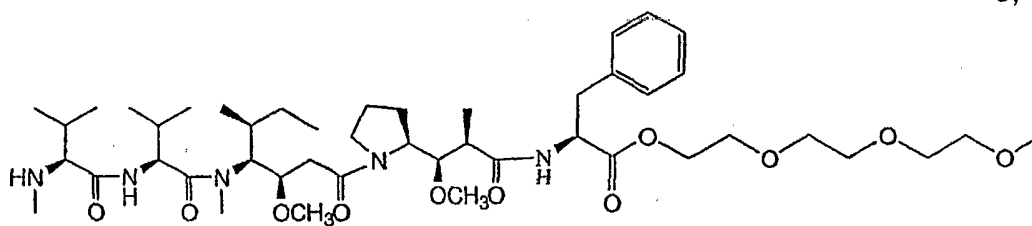
1,



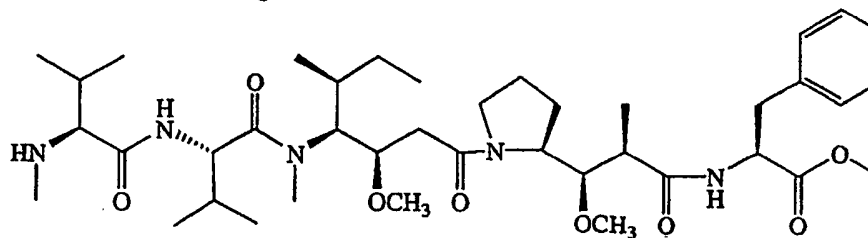
2,



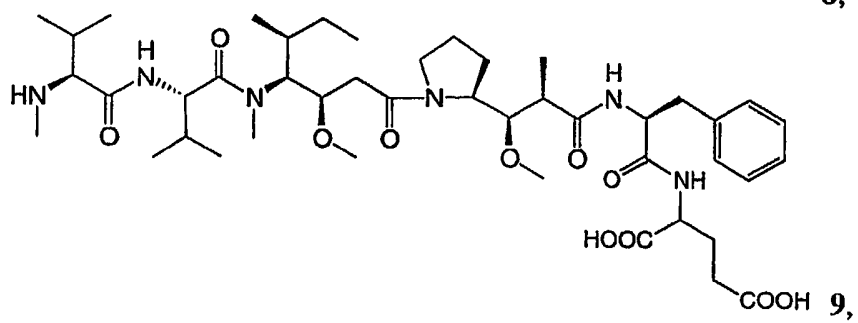
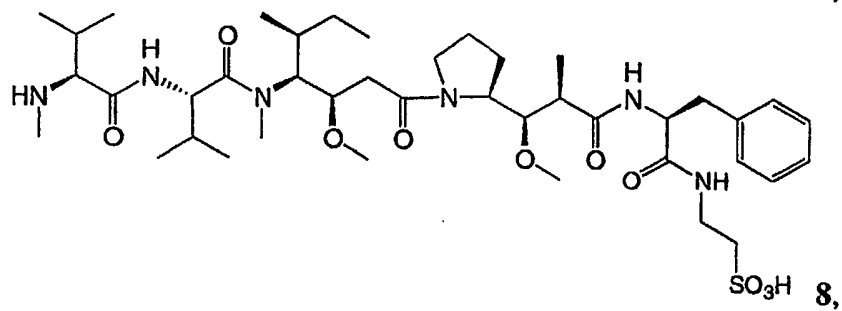
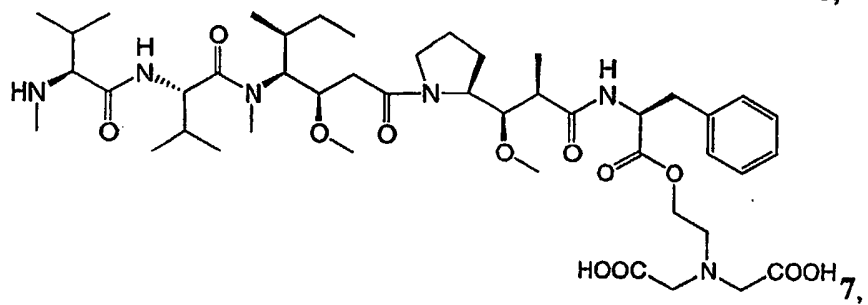
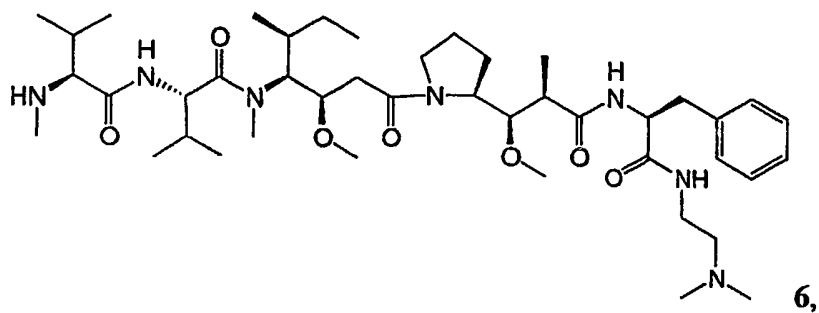
3,



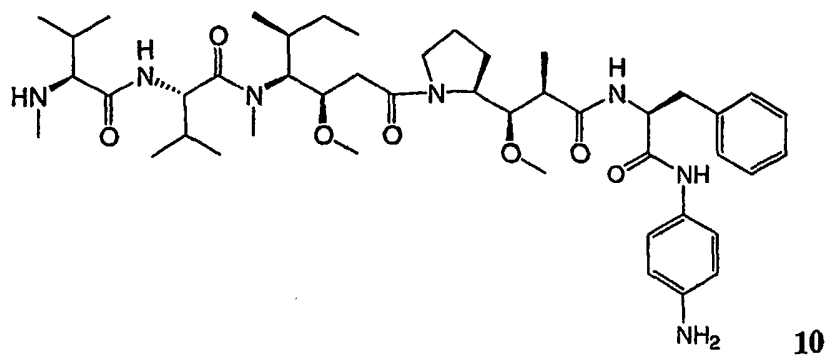
4,



5,



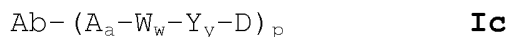
e



e sais ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos.

OS COMPOSTOS DE FÓRMULA (**Ic**)

Também são descritos no presente documento compostos de conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) que têm a Fórmula **Ic**:



que compreende um anticorpo covalentemente unido a uma ou mais unidades de fármaco (frações). Os compostos de conjugado de anticorpo-fármaco incluem sais ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

Os compostos de Fórmula **Ic** são definidos em que:

Ab é um anticorpo que se liga a um ou mais recetores de antígenos associados a tumores (1)-(35):

- (1) BMPR1B (recetor de proteína morfogenética óssea do tipo IB, N° de acesso do Genbank NM_001203);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acesso do Genbank NM_003486);
- (3) STEAP1 (seis antígenos transmembranares epiteliais de próstata, N° de acesso do Genbank NM_012449);
- (4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acesso do Genbank AF361486);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, fator de potencialização de megacariócito, mesotelina, N° de acesso do Genbank NM_005823);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, família do veículo de soluto 34 (fosfato de sódio), membro 2, portador de fosfato dependente de sódio do tipo II 3b, N° de acesso do Genbank NM_006424)
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, domínio sema, sete repetições de tromboespondina (tipo 1 e semelhante ao tipo 1), domínio de transmembrana (TM) e domínio citoplasmático curto, (semaforina) 5B, N° de acesso do Genbank AB040878);
- (8) PSCA hlg (gene de 2700050C12Rik, C530008016Rik,

ADNc de RIKEN 2700050C12, ADNc de RIKEN 2700050C12, N° de acesso do Genbank AY358628);

(9) ETBR (recetor endotelina tipo B, N° de acesso do Genbank AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acesso do Genbank NM_017763);

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gene 1 associado a cancro da próstata, proteína 1 associada a cancro da próstata, seis antígenos de transmembrana epitelial de próstata 2, seis proteínas de transmembrana da próstata, N° de acesso do Genbank AF455138);

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catião potencial de recetor transiente, subfamília M, membro 4, N° de acesso do Genbank NM_017636);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, fator de crescimento derivado de teratocarcinoma, N° de acesso do Genbank NP_003203 ou NM_003212);

(14) CD21 (CR2 (recetor de complemento 2) ou C3DR (recetor de vírus C3d/Epstein Barr) ou Hs.73792, N° de acesso do Genbank M26004);

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta imunoglobulina-associada), B29, N° de acesso do Genbank NM_000626);

(16) FcRH2, (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (domínio SH2 contendo proteína âncora de fosfatase 1a), SPAP1B, SPAP1C, N° de acesso do Genbank NM_030764);

(17) HER2 (N° de acesso do Genbank M11730);

(18) NCA (N° de acesso do Genbank M18728);

(19) MDP (N° de acesso do Genbank BC₀₁7023);

(20) IL20R α (N° de acesso do Genbank AF184971);

(21) Brevican (N° de acesso do Genbank AF229053);

(22) Ephb2R (N° de acesso do Genbank NM_004442);

(23) ASLG659 (N° de acesso do Genbank AX092328);

(24) PSCA (N° de acesso do Genbank AJ297436);

(25) GEDA (N° de acesso do Genbank AY260763);

- (26) BAFF-R (Nº de acesso do Genbank NP_443177.1);
- (27) CD22 (Nº de acesso do Genbank NP_001762.1);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa imunoglobulina-associada, uma proteína específica de célula B que interage covalentemente com beta Ig (CD79B) e forma um complexo na superfície com molécula de IgM, faz a transdução de um sinal envolvido na diferenciação de célula B, Nº de acesso do Genbank NP_001774.1);
- (29) CXCR5 (recetor 1 de linfoma de Burkitt, um recetor acoplado a proteína G que é ativado pela quimiocina CXCL13, funciona na migração de linfócito e defesa humoral, possui um papel na infeção por VIH-2 e talvez no desenvolvimento de SIDA, linfoma, mieloma, e leucemia, Nº de acesso do Genbank NP_001707.1);
- (30) HLA-DOB (subunidade beta de molécula MHC classe II (antigénio Ia) que se liga a péptidos e os apresenta aos linfócitos T CD4+, Nº de acesso do Genbank NP_002111.1);
- (31) P2X5 (canal de ião de ligando fechado P2X de recetor purinérgico, um ião de canal fechado por ATP extracelular, pode estar envolvido na transmissão sináptica e neurogénese, deficiência pode contribuir para a fisiopatologia de instabilidade de detrusor idiopático, Nº de acesso do Genbank NP_002552.2);
- (32) CD72 (antigénio de diferenciação de célula B CD72, Lyb-2, Nº de acesso do Genbank NP_001773.1);
- (33) LY64 (antigénio de linfócito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I da família de repetição rica em leucina (LRR), regula a ativação de célula B e apoptose, perda de função está associada com atividade aumentada de doença em pacientes com eritematose de lúpus sistémico, Nº de acesso do Genbank NP_005573.1);
- (34) FCRH1 (proteína 1 tipo recetor Fc, um recetor putativo para o domínio de imunoglobulina Fc que contém domínios C2 tipo Ig e ITAM, pode ter um papel

na diferenciação de linfócito B, N° de acesso do Genbank NP_443170.1); ou

(35) IRTA2 (translocação de recetor da superfamília imunoglobulina associada 2, um imunorrecetor putativo com possíveis papéis no desenvolvimento da célula B e linfomagénes; desregulação do gene pela translocação ocorre em algumas malignidades de célula B, N° de acesso do Genbank NP_112571.1).

A é uma unidade de Estirador, a é 0 ou 1,

cada W é independentemente uma unidade de Aminoácido,

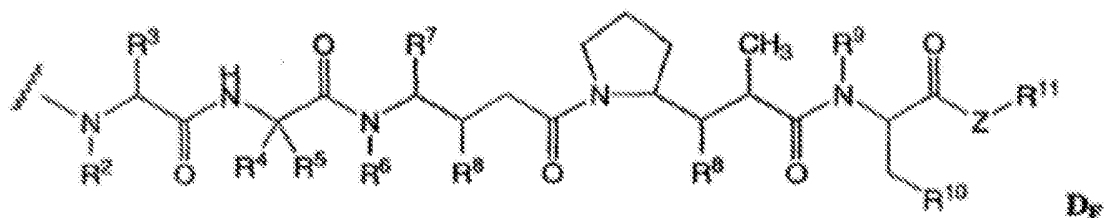
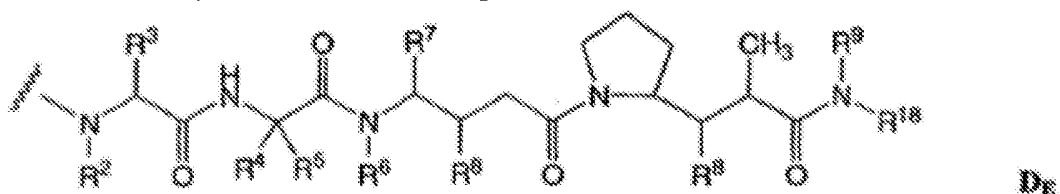
w é um número inteiro que varia de 0 a 12,

Y é uma unidade de Espaçador, e

y é 0, 1 ou 2,

p varia de 1 a cerca de 8, e

D é uma fração de Fármaco que tem a Fórmula D_E e D_F:



em que a linha ondulada de D_E e D_F indica o local de união covalente a A, W, ou Y, e independentemente em cada localização:

R² é selecionado de H e alquilo C₁-C₈;

R³ é selecionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilarilo C₁-C₈, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ e alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ é selecionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilarilo C₁-C₈, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-

C₈), heterociclo C₃-C₈ e alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ é selecionado de H e metilo;

ou R⁴ e R⁵ juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C₁-C₈ e carbociclo C₃-C₈ e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R⁶ é selecionado de H e alquilo C₁-C₈;

R⁷ é selecionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilarilo C₁-C₈, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ e alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ e O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ é selecionado de H e alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ é selecionado de arilo ou heterociclo C₃-C₈;

Z é O, S, NH, ou NR¹², em que R¹² é alquilo C₁-C₈;

R¹¹ é selecionado de H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R¹³ é alquilo C₂-C₈;

R¹⁴ é H ou alquilo C₁-C₈;

cada ocorrência de R¹⁵ é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C₁-C₈;

cada ocorrência de R¹⁶ é independentemente H, alquilo C₁-C₈, ou $-(CH_2)_n-COOH$;

R¹⁸ é selecionado de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C₃-C₈), e $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C₃-C₈);

e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Num exemplo, -Ww- é -Val-Cit-.

Noutro exemplo, R³, R⁴ e R⁷ são independentemente isopropilo ou sec-butilo e R⁵ é -H. Num exemplo, R³ e R⁴ são, cada um, isopropilo, R⁵ é -H, e R⁷ é sec-butilo.

Ainda noutro exemplo, R² e R⁶ são, cada um, metilo, e R⁹ é -

H.

Ainda noutro exemplo, cada ocorrência de R^8 é $-\text{OCH}_3$. Num exemplo, R^3 e R^4 são, cada um, isopropilo, R^2 e R^6 são, cada um, metilo, R^5 é $-\text{H}$, R^7 é sec-butilo, cada ocorrência de R^8 é $-\text{OCH}_3$, e R^9 é $-\text{H}$.

Num exemplo, Z é $-\text{O}-$ ou $-\text{NH}-$.

Num exemplo, R^{10} é arilo.

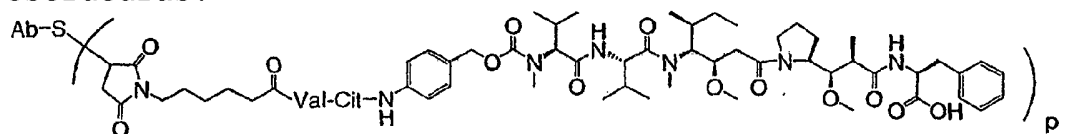
Num exemplo, R^{10} é $-\text{fenilo}$.

Num exemplo, quando Z é $-\text{O}-$, R^{11} é $-\text{H}$, metilo ou t-butilo.

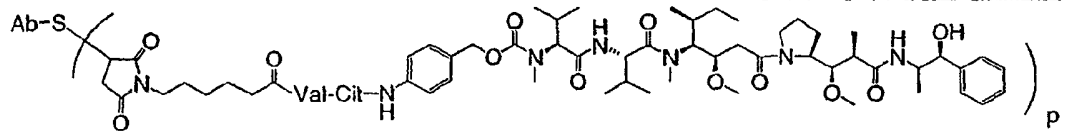
Num exemplo, quando Z é $-\text{NH}$, R^{11} é $-\text{CH}(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(R^{16})_2$, e R^{16} é $-\text{alquilo } \text{C}_1-\text{C}_8$ ou $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$.

Noutro exemplo, quando Z é $-\text{NH}$, R^{11} é $-\text{CH}(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(\text{CH}_2)_n-\text{SO}_3\text{H}$.

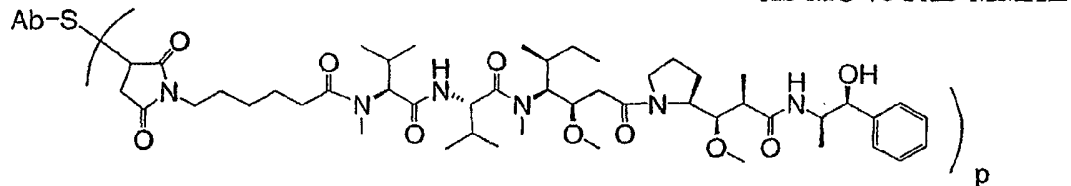
Conjugados ilustrativos de Fórmula **Ic** têm as seguintes estruturas:



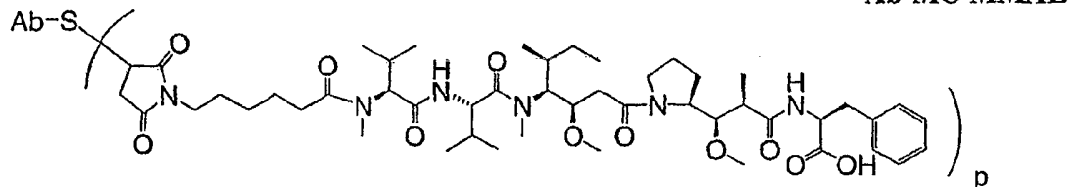
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

em que Ab é um anticorpo que se liga a um ou mais recetores de antigénio associado a tumor (1)-(35); Val é valina; e Cit é citrulina.

A carga de fármaco é representada por p, o número médio de fármacos por anticorpo numa molécula de Fórmula I. A carga de fármaco varia de 1 a 20 fármacos (D) por anticorpo (Ab ou mAb). Composições de ADC de Fórmula I incluem coleções de anticorpos conjugados com uma variedade de fármacos, de 1 a 20. O número médio de fármacos por anticorpo nas preparações de ADC de reações de conjugação pode ser caracterizado por meios convencionais tais como espectroscopia visível/UV, espectrometria de massa, análise ELISA, e HPLC. A distribuição quantitativa de ADC em termos de p pode também ser determinada. Em alguns casos, separação, purificação, e caracterização de ADC homogéneo onde p é certo valor de ADC com outras cargas de fármaco, podem ser atingidas por meios tais como HPLC de fase reversa ou eletroforese.

Para alguns conjugados de anticorpo-fármaco, p pode estar limitado pelo número de locais de união no anticorpo. Por exemplo, onde a união é uma cisteína tiol, como nas formas de realização exemplares acima, um anticorpo pode ter apenas um ou vários grupos cisteína tiol, ou pode ter apenas um ou vários grupos tiol suficientemente reativos através dos quais um ligante pode ser unido.

Tipicamente, menos que o valor teórico máximo de frações de fármaco são conjugados a um anticorpo durante a reação de conjugação. Um anticorpo pode conter, por exemplo, muitos resíduos de lisina que não reagem com o intermediário de fármaco-ligante ou reagente de ligante. Apenas os grupos de lisina mais reativos podem reagir com um reagente de ligante reativo por amina. Geralmente, anticorpos não contêm muitos, se é que contêm algum, grupos cisteína tiol livres e reativos que podem ser ligados a uma fração de fármaco. A maioria dos resíduos de cisteína tiol

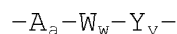
nos anticorpos dos compostos da invenção existe como pontes de bissulfeto e deve ser reduzida com um agente de redução tal como ditionotreitól (DTT). Adicionalmente, o anticorpo deve ser submetido a condições de desnaturação para revelar os grupos nucleofílicos reativos tais como lisina ou cisteína. A carga (proporção fármaco/anticorpo) de um ADC pode ser controlada de várias maneiras diferentes, incluindo: (i) limitação do excesso molar de intermediário de fármaco-ligante ou reagente de ligante em relação ao anticorpo, (ii) limitação do tempo ou temperatura da reação de conjugação, e (iii) condições redutivas parciais ou limitativas para modificação de cisteína tiol.

Deve ser entendido que onde mais de um grupo nucleofílico reage com um intermediário de fármaco-ligante, ou reagente de ligante seguido por reagente da fração de fármaco, então o produto resultante é uma mistura de compostos ADC com uma distribuição de uma ou mais frações de fármaco unidas a um anticorpo. O número médio de fármacos por anticorpo pode ser calculado a partir da mistura por análise dupla de anticorpo ELISA, específica para anticorpo e específica para o fármaco. Moléculas de ADC individuais podem ser identificadas na mistura através de espectroscopia de massa, e separadas por HPLC, por exemplo, cromatografia de interação hidrofóbica ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al., Resumo N° 624, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, 27-31 de Março de 2004; Proceedings of the AACR, Volume 45, Março de 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al., Resumo N° 627, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, 27-31 de Março de 2004; Proceeding of the AACR, Volume 45, Março de 2004). Assim, um ADC homogéneo com um valor de carga único pode ser isolado da mistura de

conjugação por eletroforese ou cromatografia.

4.3 A UNIDADE DE LIGANTE

Uma "unidade de Ligante" (LU) é um composto bifuncional que pode ser usado para unir uma unidade de Fármaco e uma unidade de Ligando para formar Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando, ou que é útil na formação de imunoconjugados direcionados contra antigénios associados a tumor. Estes imunoconjugados permitem a aplicação seletiva de fármacos tóxicos a células tumorais. Numa forma de realização, a unidade de Ligante do Composto de Fármaco-Ligante e Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando possui a fórmula:



em que:

-A- é uma unidade de Estirador;

a é 0 ou 1;

cada -W- é independentemente uma unidade de Aminoácido;

w é independentemente um número inteiro que varia de 0 a 12;

-Y- é uma unidade de Espaçador; e

y é 0, 1 ou 2.

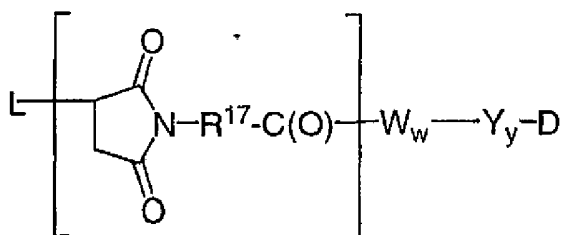
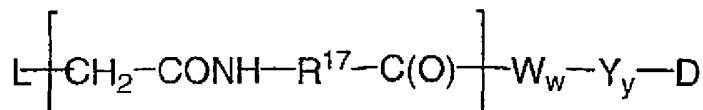
No Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando, o Ligante é capaz de unir a fração de Fármaco e a unidade de Ligando.

4.3.1 A UNIDADE DE ESTIRADOR

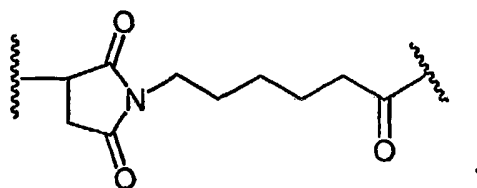
A unidade de Estirador (-A-), quando presente, é capaz de unir uma unidade de Ligando a uma unidade de aminoácido (-W-). Com relação a isto, um Ligando (L) possui um grupo funcional que pode formar uma ligação com um grupo funcional de uma unidade de Estirador. Grupos funcionais úteis que podem estar presentes num ligando, tanto por ocorrência natural quanto via manipulação química, incluem, mas não se limitam a sulfidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, o grupo hidroxilo anomérico de um hidrato de carbono, e carboxilo. Num aspeto, os grupos funcionais de Ligando são sulfidrilo e amino. Grupos sulfidrilo podem ser

gerados pela redução de uma ligação de bissulfeto intramolecular de um Ligando. Alternativamente, grupos sulfidrílo podem ser gerados pela reação de um grupo amino de uma fração lisina de um Ligando, usando 2-iminotiolano (reagente de Traut) ou um outro reagente gerador de sulfidrílo.

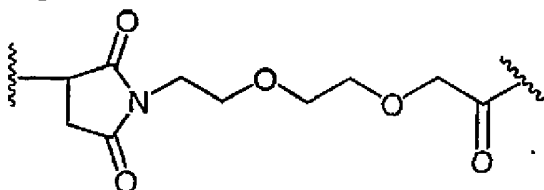
Numa forma de realização, a unidade de Estirador forma uma ligação com um átomo de enxofre da unidade de Ligando. O átomo de enxofre pode ser derivado de um grupo sulfidrílo de um Ligando. Unidades de Estirador representativas desta forma de realização são ilustradas dentro dos colchetes das Fórmulas **IIIa** e **IIIb**, onde L-, -W-, -Y-, -D, w e y são conforme definidos acima, e R¹⁷ é selecionado a partir de -alquileno C₁-C₁₀-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquileno C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileno C₁-C₁₀-, -alquileno C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileno C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileno C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileno C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, e (CH₂CH₂O)_r-CH₂-; e r é um número inteiro que varia de 1-10. Deve ser entendido a partir das formas de realização exemplares de Fórmula **Ia**, tal como **III-VI**, que mesmo onde não denotado expressamente, de 1 a 20 frações de fármaco estão ligadas a um ligando (p = 1-20).

**IIIa****IIIb**

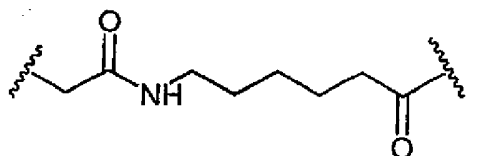
Uma unidade de Estirador ilustrativa é aquela de Fórmula **IIIa** em que R¹⁷ é -(CH₂)₅-:



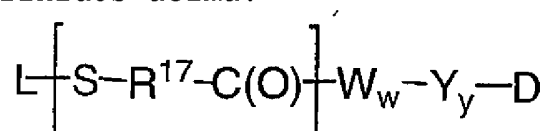
Uma outra unidade de Estirador ilustrativa é aquela de Fórmula **IIIa** em que R^{17} é $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; e r é 2:



Ainda uma outra unidade de Estirador ilustrativa é aquela de Fórmula **IIIb** onde R^{17} é $-(CH_2)_5-$:



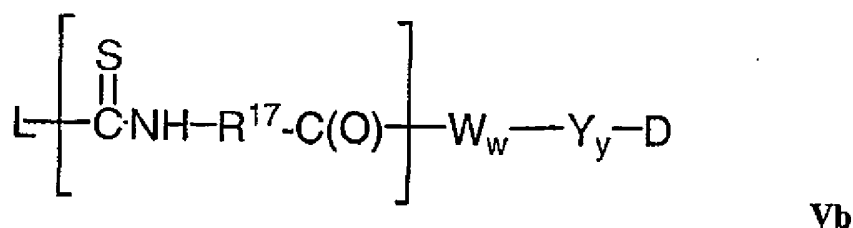
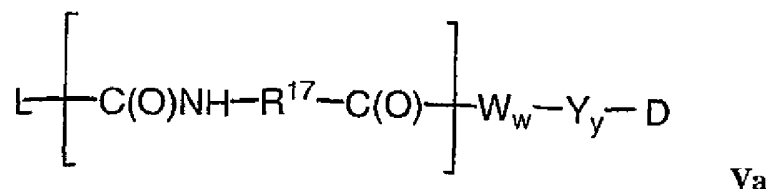
Noutro exemplo, a unidade de Estirador é ligada à unidade de Ligando através de uma ligação de bissulfeto entre um átomo de enxofre da unidade de Ligando e um átomo de enxofre da unidade de Estirador. Uma unidade de Estirador representativa é ilustrada dentro dos colchetes de Fórmula IV, onde R^{17} , $L-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w e y são conforme definidos acima.



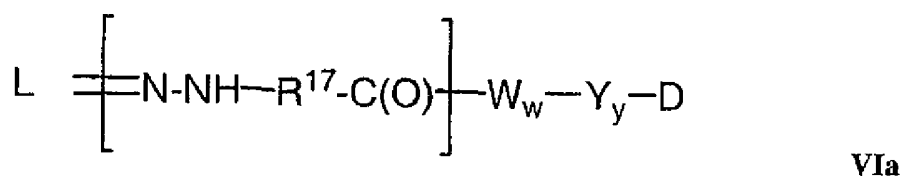
IV

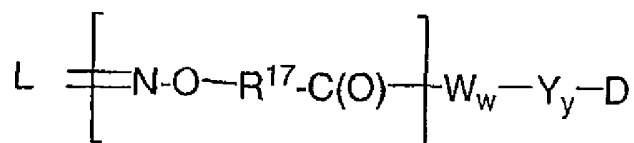
Ainda noutro exemplo, o grupo reativo do Estirador contém um local reativo que pode formar uma ligação com um grupo amino primário ou secundário de um Ligando. Exemplos destes locais reativos incluem, mas não se limitam a, ésteres ativados tais como ésteres de succinimida, 4-nitrofenilésteres, pentafluorofenilésteres, tetrafluorofenilésteres, anidridos, cloretos ácidos, cloretos de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

Unidades de Estirador representativas I são ilustradas dentro dos colchetes das Fórmulas Va e Vb, onde $-R^{17}-$, L-, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w e y são conforme definidos acima.

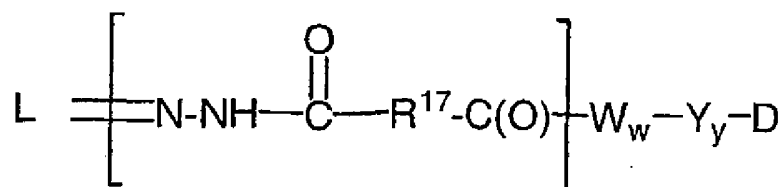


O grupo reativo do Estirador pode conter um local reativo que é reativo para um grupo de hidrato de carbono modificado ($-CHO$) que pode estar presente num Ligando. Por exemplo, um hidrato de carbono pode ser fracamente oxidado usando um reagente tal como periodato de sódio e a unidade resultante ($-CHO$) do hidrato de carbono oxidado pode ser condensada com um Estirador que contém uma funcionalidade tal como uma hidrazida, uma oxima, uma amina primária ou secundária, uma hidrazina, uma tiossemicarbazona, um carboxilato de hidrazina e uma arilidrazida tal como aquelas descritas por Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem 2:133-41. Unidades de Estirador representativas são ilustradas dentro dos colchetes de Fórmulas **VIa**, **VIb**, e **VIc**, onde $-R^{17}-$, L-, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w e y são conforme definidos acima.





VIb

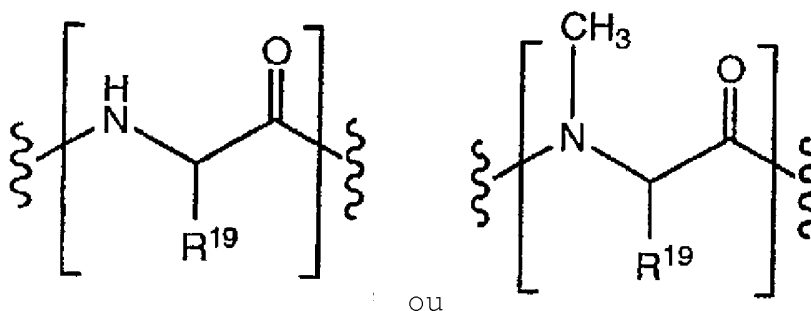


VIc

4.3.2 A UNIDADE DE AMINOÁCIDO

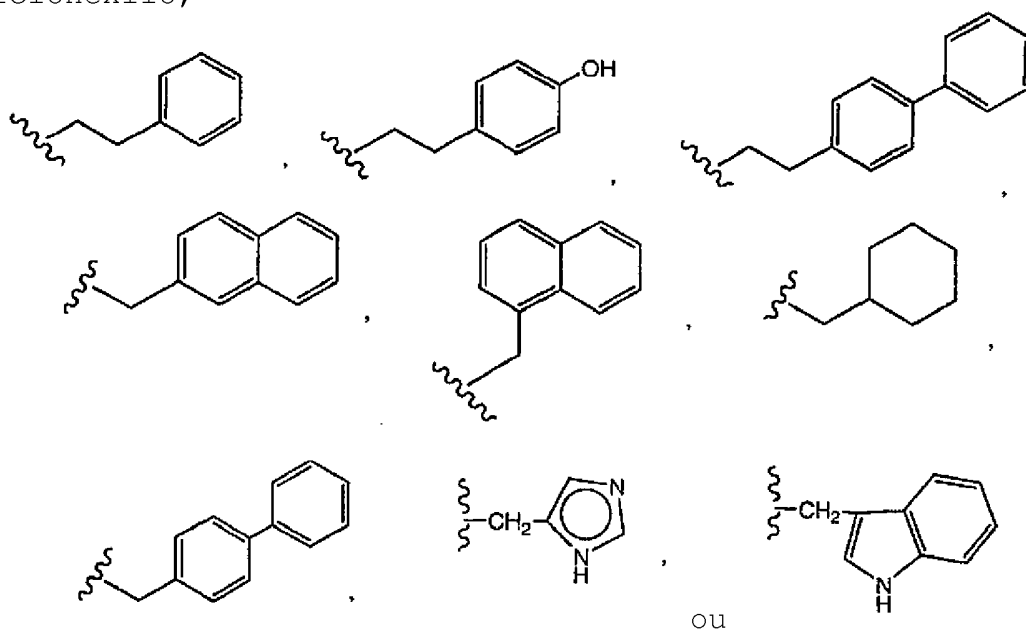
A unidade de Aminoácido (-W-), quando presente, liga a unidade de Estirador à unidade de Espaçador se a unidade de Espaçador estiver presente, liga a unidade de Estirador à fração de Fármaco se a unidade de Espaçador estiver ausente, e liga a unidade de Ligando à unidade de Fármaco se a unidade de Estirador e unidade de Espaçador estiverem ausentes.

W_w - é uma unidade de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decaapéptido, undecapéptido ou dodecapéptido. Cada unidade -W- independentemente tem a fórmula denotada a seguir entre colchetes, e w é um número inteiro que varia de 0 a 12.

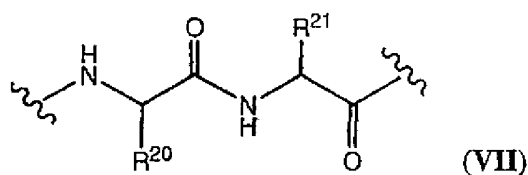


em que R^{19} é hidrogénio, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, benzilo, p-hidroxibenzilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, -

$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



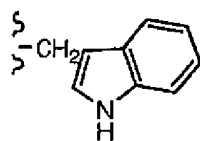
A unidade de Aminoácido pode ser clivada enzimaticamente por uma ou mais enzimas, incluindo uma protease associada a tumor, para libertar a unidade de Fármaco (-D), que numa forma de realização é protonada *in vivo* mediante libertação para proporcionar um Fármaco (D). Unidades W_w ilustrativas são representadas pelas fórmulas (VII) - (IX) :



em que R^{20} e R^{21} são como se segue:

R^{20}	R^{21}
Benzilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Metilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Isopropilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Isopropilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$
Benzilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$
Isobutilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$

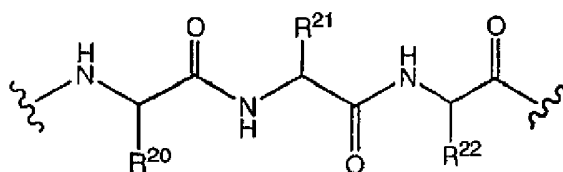
sec-butilo

 $(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$  $(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$

Benzilo

metilo; e

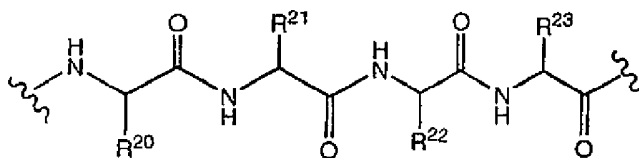
Benzilo

 $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 

(VIII)

em que R^{20} , R^{21} e R^{22} são como se segue:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
Benzilo	Benzilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Isopropilo	Benzilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; e
H	Benzilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$



(IX)

em que R^{20} , R^{21} , R^{22} e R^{23} são como se segue:

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	benzilo	Isobutilo	H; e
Metilo	isobutilo	Metilo	isobutilo.

Unidades de Aminoácido exemplares incluem, mas não se limitam a unidades de fórmula (VII) onde: R^{20} é benzilo e R^{21} é $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; R^{20} é isopropilo e R^{21} é $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; R^{20} é isopropilo e R^{21} é $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$. Uma outra unidade de Aminoácido exemplar é uma unidade de fórmula (VIII) onde R^{20} é benzilo, R^{21} é benzilo, e R^{22} é $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$.

Unidades úteis $-\text{W}_w-$ podem ser designadas e otimizadas nas suas seletividades para clivagem enzimática por enzimas

específicas, por exemplo, uma protease associada a tumor. Num exemplo, uma unidade $-W_w-$ é aquela cuja clivagem é catalisada por catepsina B, C e D, ou por uma protease plasmina.

Num exemplo, $-W_w-$ é um dipéptido, tripéptido, tetrapéptido ou pentapéptido.

Quando R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} ou R^{23} é diferente de hidrogénio, o átomo de carbono ao qual R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} ou R^{23} está unido é quiral.

Cada átomo de carbono ao qual R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} ou R^{23} é unido está independentemente na configuração (S) ou (R).

Num exemplo da unidade de Aminoácido, a unidade de Aminoácido é valina-citrulina. Num outro aspeto, a unidade de Aminoácido é fenilalanina-lisina (isto é, fk). Ainda noutro exemplo da unidade de Aminoácido, a unidade de Aminoácido é N-metilvalina-citrulina. Em ainda um outro aspeto, a unidade de Aminoácido é ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato lisina, cicloexilalanina lisina, ácido isonopecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina e ácido isonopecótico.

Em certos casos, a unidade de Aminoácido pode compreender aminoácidos naturais. Noutros casos, a unidade de Aminoácido pode compreender aminoácidos não naturais.

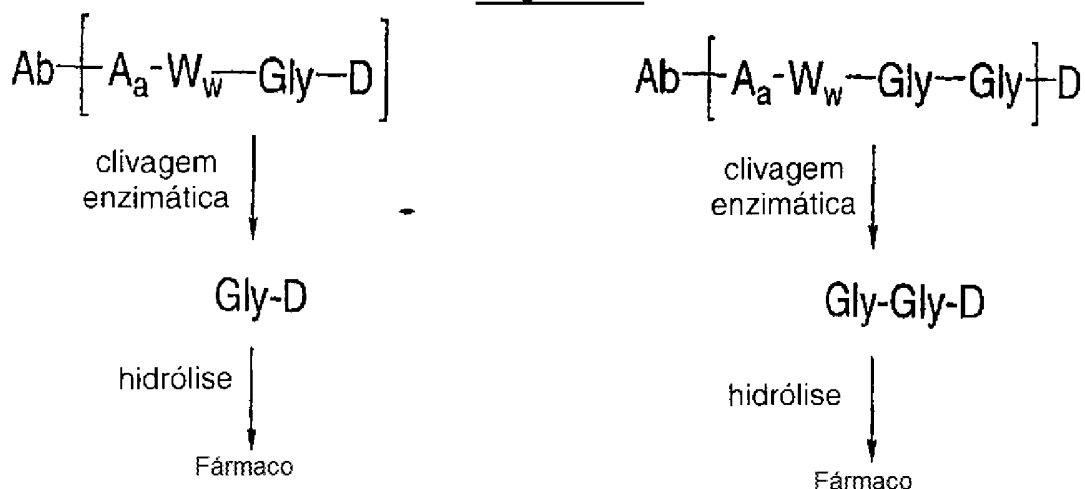
4.3.3 A UNIDADE DE ESPAÇADOR

A unidade de Espaçador ($-Y-$), quando estiver presente, liga uma unidade de Aminoácido à fração de fármaco quando uma unidade de Aminoácido estiver presente. Alternativamente, a unidade de Espaçador liga a unidade de Estirador à fração de Fármaco quando a unidade de Aminoácido estiver ausente. A unidade de Espaçador também liga a fração de Fármaco à unidade de Ligando quando a unidade de Aminoácido e a unidade de Estirador estiverem ausentes.

Unidades de Espaçador são de dois tipos gerais: auto-

sacrificial e não auto-sacrificial. Uma unidade de Espaçador não auto-sacrificial é aquela na qual parte ou toda a unidade de Espaçador permanece ligada à fração de Fármaco após clivagem, especialmente enzimática, de uma unidade de Aminoácido do Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando ou Composto de Fármaco-Ligante. Exemplos de uma unidade de Espaçador não auto-sacrificial incluem, mas não se limitam a uma unidade de Espaçador (glicina-glicina) e uma unidade de Espaçador glicina (ambas ilustradas no Esquema 1) (*infra*). Quando um Composto Exemplar contendo uma unidade de Espaçador glicina-glicina ou uma unidade de Espaçador glicina sofre clivagem enzimática através de protease associada à célula tumoral, protease associada a célula cancerígena ou uma protease associada a linfócito, uma fração glicina-glicina-Fármaco ou uma fração glicina-Fármaco é clivada de L-A_a-W_w-. Numa forma de realização, uma reação de hidrólise independente ocorre dentro da célula alvo, que cliva a fração de glicina-Fármaco ligada e que liberta o Fármaco.

Numa outra forma de realização, -Y_y- é uma unidade de álcool p-aminobenzílico (PAB) (veja-se Esquemas 2 e 3) cuja fração fenileno é substituída por Q_m onde Q é alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; e m é um inteiro que varia de 0-4.

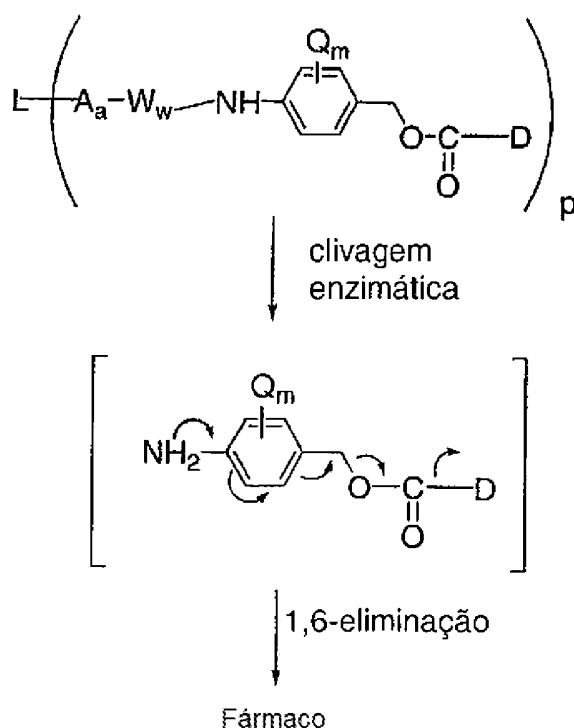
Esquema 1

Num exemplo, uma unidade de Espaçador não auto-sacrificial (-Y-) é -Gly-Gly-.

Noutro exemplo, uma unidade de Espaçador não auto-sacrificial (-Y-) é -Gly-.

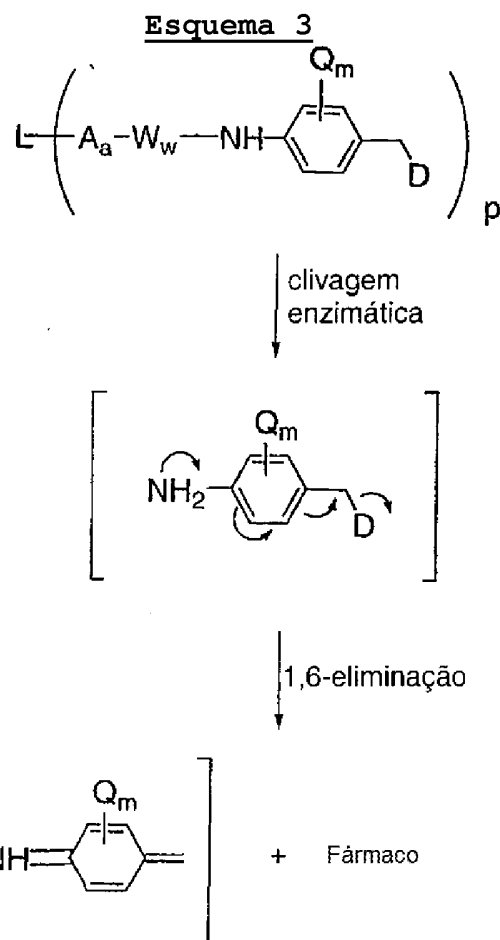
Num exemplo, é proporcionado um Composto de Fármaco-Ligante ou um Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando em que a unidade de Espaçador está ausente ($y=0$), ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

Alternativamente, um Composto Exemplar contendo uma unidade de Espaçador auto-sacrificial pode libertar -D sem a necessidade de uma etapa de hidrólise separada. Nesta forma de realização, -Y- é um grupo PAB que está ligado a $-W_w-$ através do átomo de nitrogénio aminado do grupo PAB, e conectado diretamente à -D através de um carbonato, carbamato ou grupo éter. Sem estar limitado por qualquer teoria ou mecanismo específico, o Esquema 2 ilustra um possível mecanismo de libertação de Fármaco de um grupo PAB que está unido diretamente a -D através de um grupo carbamato ou carbonato patrocinado por Toki et al. (2002) J Org. Chem. 67:1866-1872.

Esquema 2

em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogênio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4; e p varia de 1 a cerca de 20.

Sem estar limitado por qualquer teoria ou mecanismo específico, o Esquema 3 ilustra um possível mecanismo de libertação de Fármaco de um grupo PAB que está unido diretamente a -D através de uma ligação de éter ou amina.



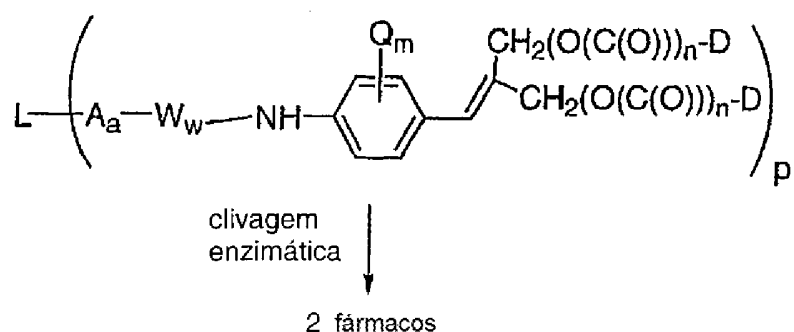
em que Q é -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -halogénio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4; e p varia de 1 a cerca de 20.

Outros exemplos de espaçadores auto-sacrificais incluem, mas não se limitam a compostos aromáticos que são eletronicamente semelhantes ao grupo PAB tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) e orto- ou para-aminobenzilacetais. Podem ser usados Espaçadores que sofrem ciclização mediante hidrólise de ligação de amida, tal como ácido 4-aminobutírico amidas substituídas ou não substituídas (Rodrigues, et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anel biciclo[2.2.1] e biciclo[2.2.2] apropriadamente substituídos (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) e amidas do ácido 2-

aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 5867). A eliminação de fármacos contendo amina que são substituídas na posição a de glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) são também exemplos de espaçador auto-sacrificial úteis nos Compostos Exemplares.

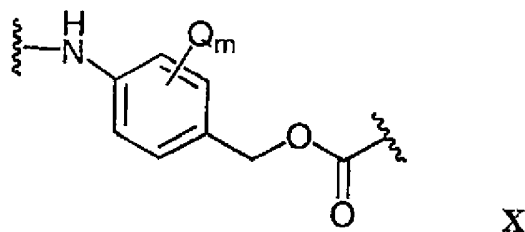
Num exemplo, a unidade de Espaçador é uma unidade bis(hidroximetil)estireno ramificada (BHMS) conforme ilustrado no Esquema 4, que pode ser usada para incorporar e libertar diversos fármacos.

Esquema 4

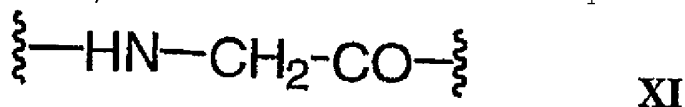


em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4; n é 0 ou 1; e p varia de 1 a cerca de 20.

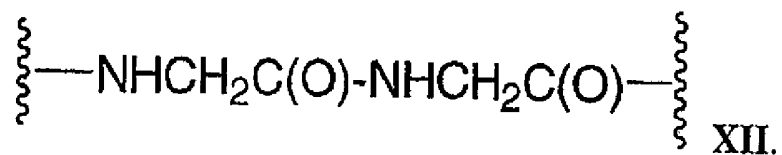
Num exemplo, as frações -D são iguais. Em ainda uma outra forma de realização, as frações -D são diferentes. Num exemplo, unidades de Espaçador (-Y_y-) são representadas pelas Fórmulas (X)-(XII):



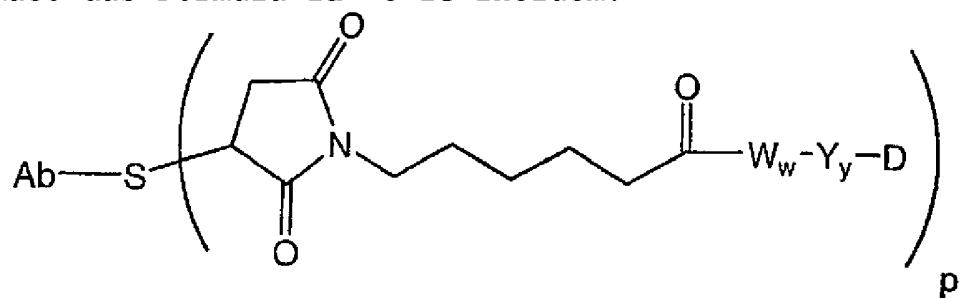
em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; e m é um número inteiro que varia de 0-4.



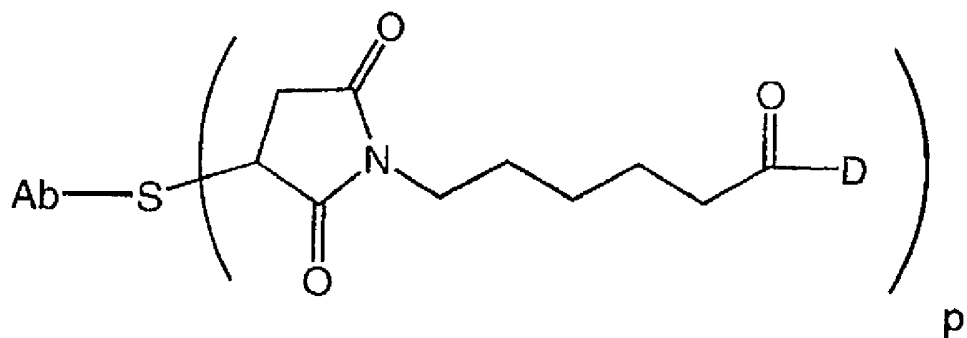
e



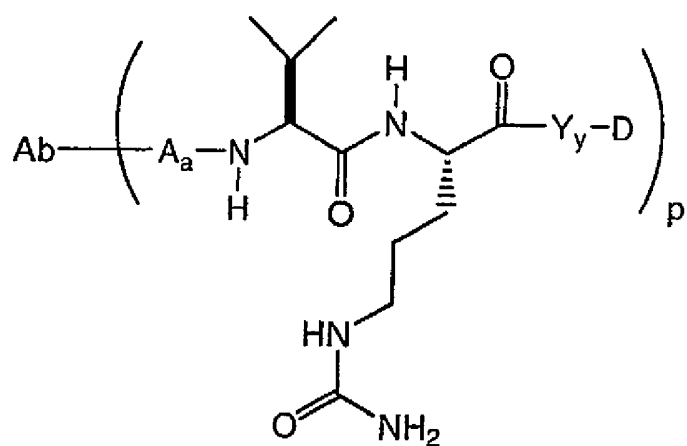
Exemplos dos compostos de conjugado de anticorpo-fármaco das Fórmulas **Ia'** e **Ic** incluem:

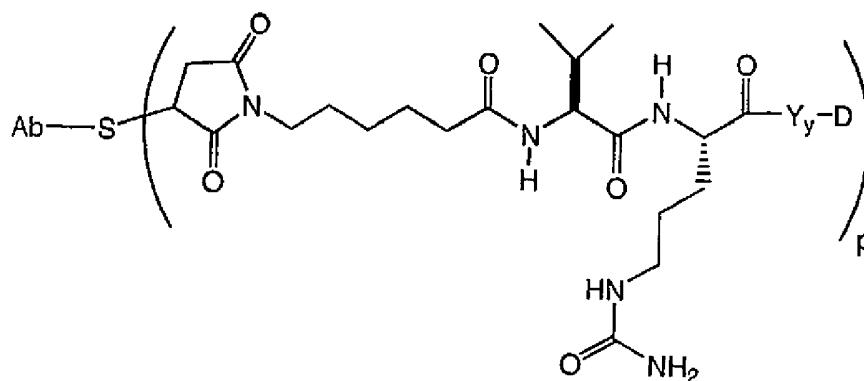


e,

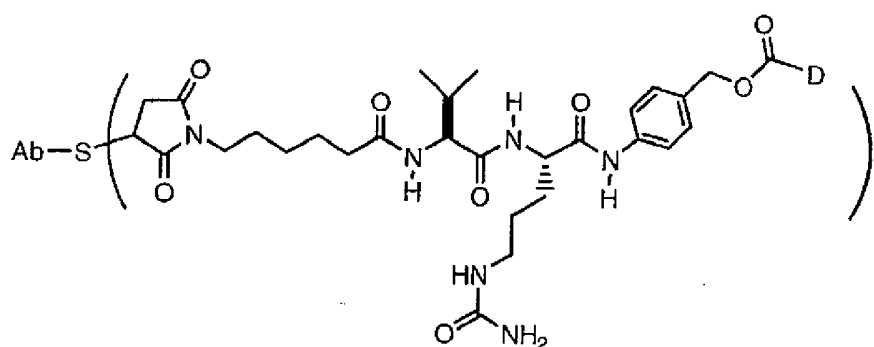


em que w e y são, cada um, 0,





e

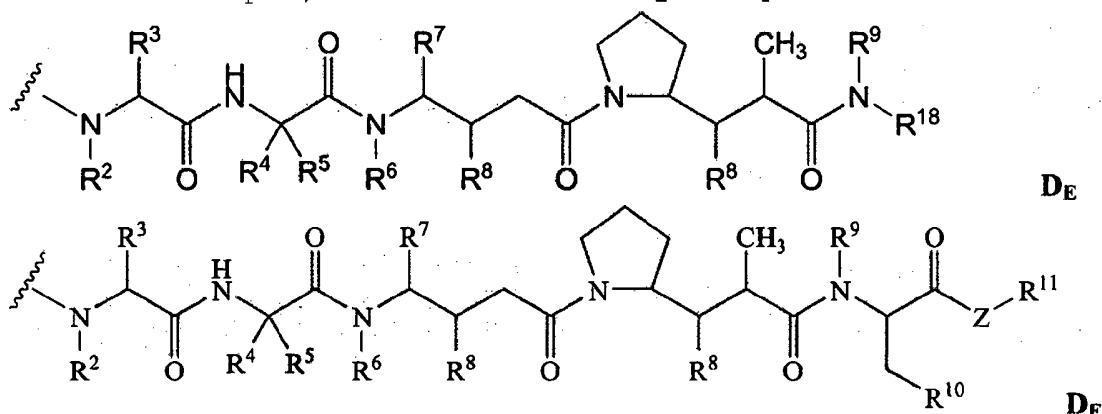


4.4 A UNIDADE DE FÁRMACO (FRAÇÃO)

A fração de fármaco (D) dos conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) são do tipo dolastatina/auristatina (Patente US N° 5635483; 5780588) que demonstraram interferir com a dinâmica de microtúbulo, hidrólise GTP, e divisão nuclear e celular (Woyke *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584 e têm atividade anticancerígena (Patente US N° 5663149) e antifúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965).

D é uma unidade de Fármaco (fração) que tem um átomo de nitrogénio que pode formar uma ligação com a unidade de Espaçador quando $y = 1$ ou 2 , com o grupo carboxilo C-terminal de uma unidade de Aminoácido quando $y = 0$, com o grupo carboxilo de uma unidade de Estirador quando w e $y = 0$, e com o grupo carboxilo de uma unidade de Fármaco quando a , w , e $y = 0$. Deve ser entendido que os termos "unidade de fármaco" e "fração de fármaco" são sinónimos e usados de forma intercambiável no presente documento.

Num exemplo, -D é da fórmula D_E ou D_F :



em que, independentemente em cada localização:

R^2 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^3 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, aquilarilo C_1-C_8 , alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, aquilarilo C_1-C_8 , alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 é selecionado de H e metilo;

ou R^4 e R^5 juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C_1-C_8 e carbociclo C_3-C_8 e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, aquilarilo C_1-C_8 , alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de arilo ou heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH, ou NR^{12} , em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1-1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, $COOH$, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} é selecionado de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), e $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8);

e

n é um número inteiro variando de 0 a 6.

Num exemplo, R^3 , R^4 e R^7 são independentemente isopropilo ou sec-butilo e R^5 é -H. Num exemplo, R^3 e R^4 são, cada um, isopropilo, R^5 é H, e R^7 é sec-butilo.

Noutro exemplo, R^2 e R^6 são, cada um, metilo, e R^9 é H.

Ainda noutro exemplo, cada ocorrência de R^8 é $-OCH_3$. Num exemplo, R^3 e R^4 são, cada um, isopropilo, R^2 e R^6 são, cada um, metilo, R^5 é H, R^7 é sec-butilo, cada ocorrência de R^8 é $-OCH_3$, e R^9 é H.

Num exemplo, Z é $-O-$ ou $-NH-$.

Num exemplo, R^{10} é arilo.

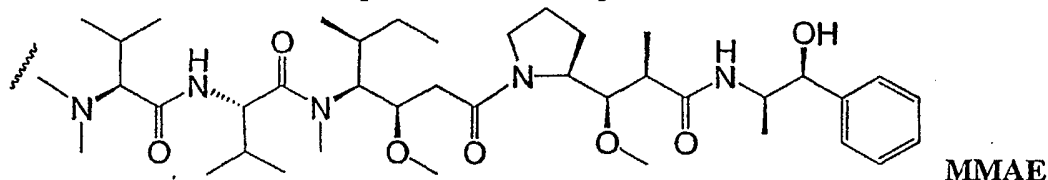
Num exemplo, R^{10} é fenilo.

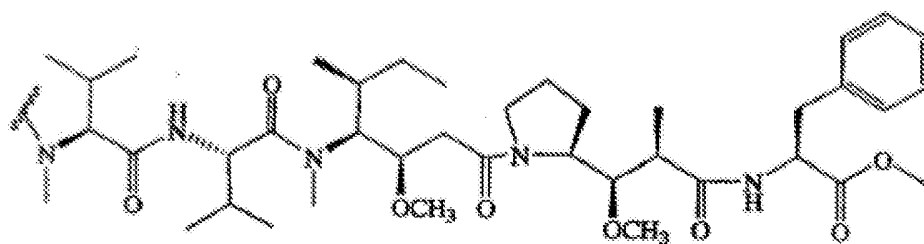
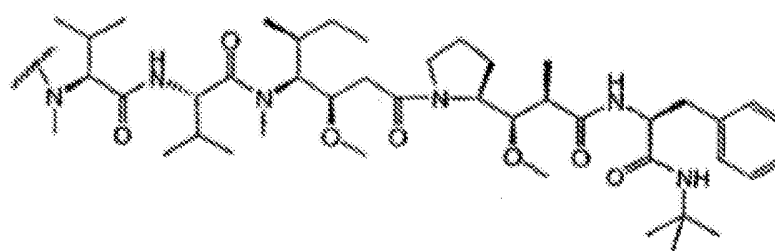
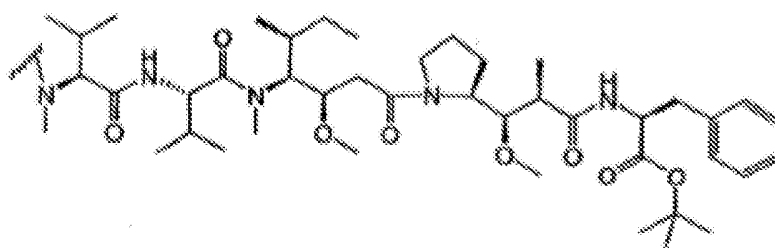
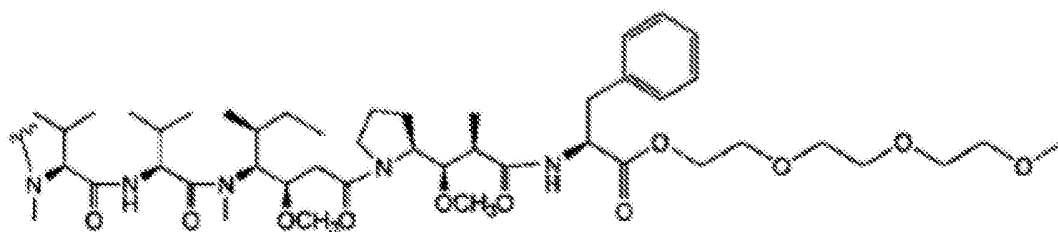
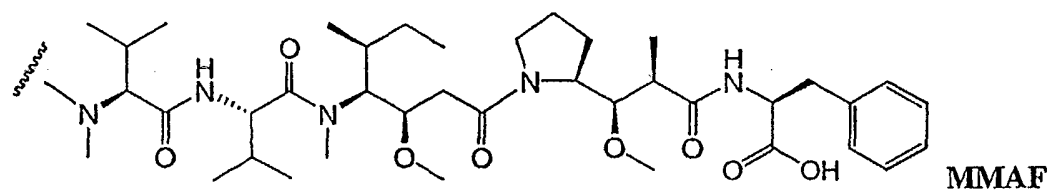
Num exemplo, quando Z é $-O-$, R^{11} é H, metilo ou t-butilo.

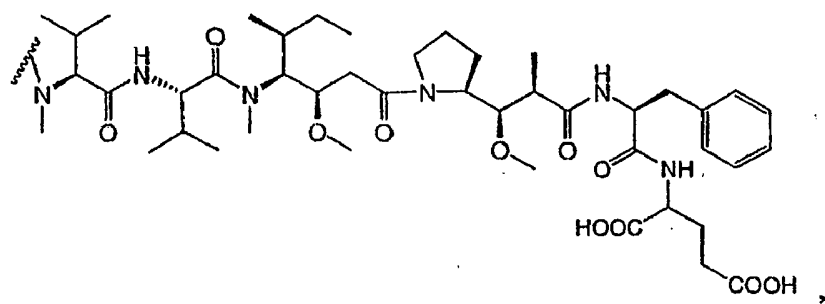
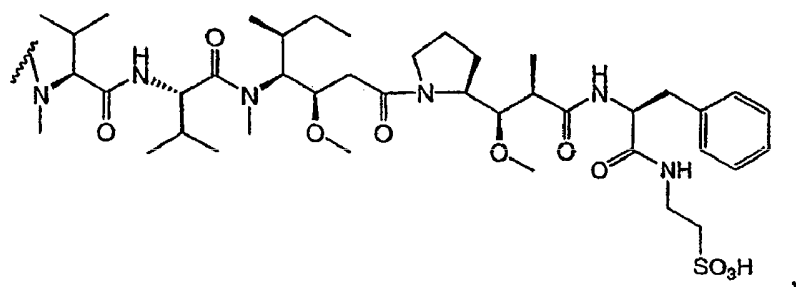
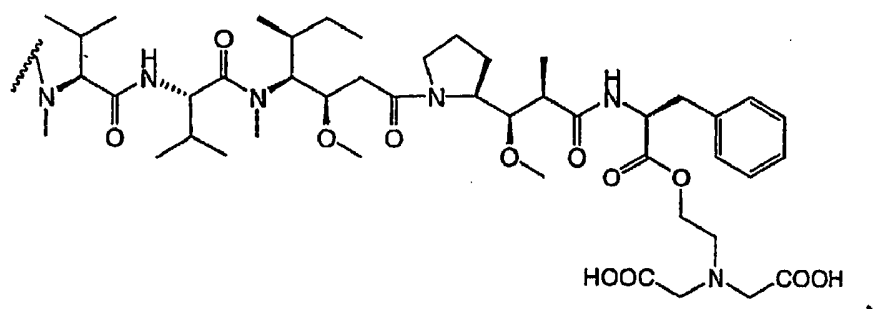
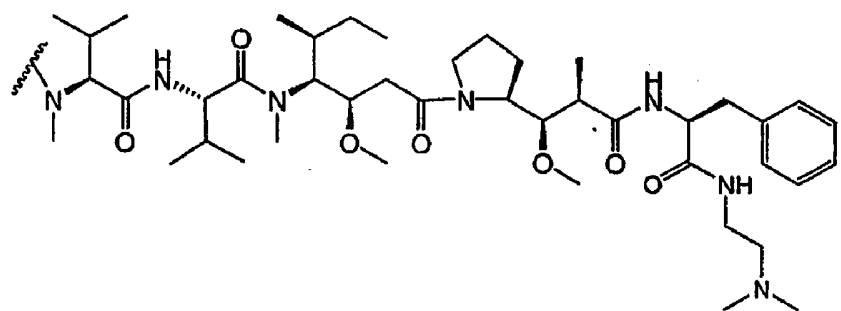
Num exemplo, quando Z é $-NH$, R^{11} é $-CH(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, e R^{16} é -alquilo C_1-C_8 ou $-(CH_2)_n-COOH$.

Num exemplo, quando Z é $-NH$, R^{11} é $-CH(R^{15})_2$, em que R^{15} é $-(CH_2)_n-SO_3H$.

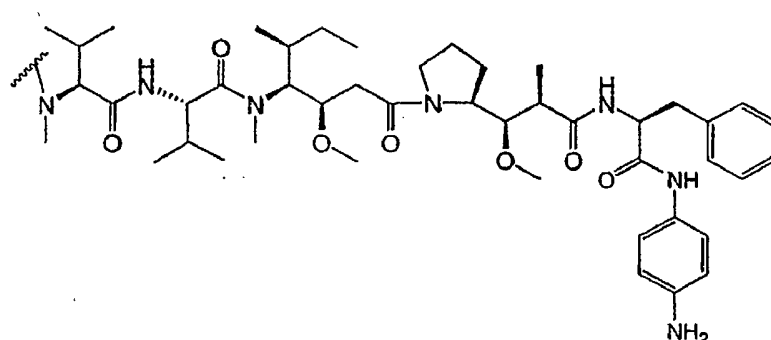
Unidades de Fármaco (-D) ilustrativas incluem as unidades de fármaco que tem as seguintes estruturas:







e



e sais ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos.

Grupos hidrofílicos, tais como, mas não limitados a trietilenoglicol ésteres (TEG), conforme mostrado acima, podem ser unidos à Unidade de Fármaco em R¹¹. Sem estar limitado pela teoria, os grupos hidrofílicos auxiliam na internalização e não aglomeração da Unidade de Fármaco.

4.5 A UNIDADE DE LIGANDO

A unidade de Ligando (L-) inclui dentro de seu âmbito qualquer unidade de um Ligando (L) que se ligue ou reativamente se associe ou forme um complexo com um recetor, antigénio ou outra fração recetiva associada com uma população de célula alvo dada. Um Ligando é uma molécula que se liga, forma um complexo, ou reage com uma fração de uma população de células que se destinam a serem terapêuticamente ou, por outro lado, biologicamente modificadas. Num exemplo, a unidade de Ligando age para aplicar a unidade de Fármaco a uma população de célula alvo específica com a qual a unidade de Ligando reage. Estes Ligandos incluem, mas não se limitam a, proteínas de grande peso molecular tais como, por exemplo, anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpo, proteínas de peso molecular menor, polipéptido ou péptidos, lectinas, glicoproteínas, não péptidos, vitaminas, moléculas de transporte de nutriente (tal como, mas não limitadas a transferina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação de célula.

Uma unidade de Ligando pode formar uma ligação com uma

unidade de Estirador, uma unidade de Aminoácido, uma Unidade de Espaçador, ou uma Unidade de Fármaco. Uma unidade de Ligando pode formar uma ligação com uma unidade de Ligante através de um heteroátomo do Ligando. Heteroátomos que podem estar presentes numa unidade de Ligando incluem enxofre (numa forma de realização, de um grupo sulfidrilo de um Ligando), oxigénio (numa forma de realização, de um grupo carbonilo, carboxilo ou hidroxilo de um Ligando) e nitrogénio (numa forma de realização, de um grupo amino primário ou secundário de um Ligando). Estes heteroátomos podem estar presentes no Ligando no estado natural do Ligando, por exemplo, um anticorpo de ocorrência natural, ou podem ser introduzidos no Ligando através de modificação química.

Num exemplo, um Ligando possui um grupo sulfidrilo e o Ligando liga-se à unidade de Ligante através do átomo de enxofre do grupo sulfidrilo.

Em ainda um outro exemplo, o Ligando tem um ou mais resíduos de lisina que podem ser modificados quimicamente para introduzir um ou mais grupos sulfidrilo. A unidade de Ligando liga-se à unidade de Ligante através do átomo de enxofre do grupo sulfidrilo. Os reagentes que podem ser usados para modificar lisinas incluem, mas não se limitam a S-acetiltiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) e cloridrato de 2-iminotiolano (Reagente de Traut).

Noutro exemplo, o Ligando pode ter um ou mais grupos hidrato de carbono que podem ser modificados quimicamente para ter um ou mais grupos sulfidrilo. A unidade de Ligando liga-se à unidade de Ligante, tal como a unidade de Estirador, através do átomo de enxofre do grupo sulfidrilo.

Ainda noutro exemplo, o Ligando pode ter um ou mais grupos hidrato de carbono que podem ser oxidados para proporcionar um grupo aldeído ($-CHO$) (veja-se, por exemplo, Laguzza et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). O aldeído correspondente pode formar uma ligação com

um Local Reativo numa unidade de Estirador. Locais Reativos num Estirador que podem reagir com um grupo carbonilo num Ligando incluem, mas não se limitam a hidrazida e hidroxilamina. Outros protocolos para a modificação de proteínas para a união ou associação de Unidades de Fármaco são descritos por Coligan *et al.*, Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & sons (2002).

Proteína não imunorreativa, polipéptido, ou Ligandos de péptido úteis incluem, mas não se limitam a transferrina, fatores de crescimento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido de libertação de gastrina, fator de crescimento derivado de plaqueta, IL-2, IL-6, fatores de crescimento de transformação ("TGF"), tais como TGF- α e TGF- β , fator de crescimento de vacínia ("VGF"), insulina e fatores de crescimento tipo insulina I e II, lectinas e apoproteína de lipoproteína de baixa densidade.

Anticorpos policlonais úteis são populações heterogêneas de moléculas de anticorpo derivadas do soro de animais imunizados. Vários procedimentos bem conhecidos na técnica podem ser usados para a produção de anticorpos policlonais para um antígeno de interesse. Por exemplo, para a produção de anticorpos policlonais, vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção com um antígeno de interesse ou derivado do mesmo, incluindo, mas não limitado a coelhos, ratinhos, ratos, e cobaias. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies hospedeiras, e incluindo, mas não limitados a adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis minerais tais como hidróxido de alumínio, substância tensioativas tais como lisolecitinas, polióis plurónicos, polianióes, péptidos, emulsões de óleo, hemocianinas do molusco "key-hole", dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis tais como BCG (bacilo Calmette-Guerin), e *Corynebacterium parvum*. Estes adjuvantes são também conhecidos na técnica.

Anticorpos monoclonais úteis são populações homogêneas de anticorpos para um determinante antigénico específico (por exemplo, um antigénio de célula cancerígena, um antigénio viral, um antigénio microbiano, uma proteína, um péptido, um hidrato de carbono, um produto químico, um ácido nucleico, ou fragmentos dos mesmos). Um anticorpo monoclonal (mAb) para um antigénio de interesse pode ser preparado através da utilização de qualquer técnica conhecida na técnica que proveja a produção de moléculas de anticorpo por linhas celulares contínuas em cultura. Estas técnicas incluem, mas não se limitam à técnica do hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256, 495-497), a técnica do hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), e a técnica do hibridoma EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Estes anticorpos podem ser de qualquer classe de imunoglobulina incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD e de qualquer subclasse das mesmas. O hibridoma que produz mAbs de utilização nesta invenção pode ser cultivado *in vitro* ou *in vivo*.

Anticorpos monoclonais úteis incluem, mas não se limitam a anticorpos monoclonais humanos, anticorpos monoclonais humanizados, fragmentos de anticorpos, anticorpos monoclonais quiméricos humano-ratinho (ou outras espécies). Anticorpos monoclonais humanos podem ser feitos por qualquer uma dentre numerosas técnicas conhecidas na técnica (por exemplo, Teng et al. 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 7308-7312; Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4, 72-79; e Olsson et al., 1982, *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).

O anticorpo pode também ser um anticorpo biespecífico. Métodos para preparar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-

expressão de dois pares de imunoglobulina de cadeia pesada-cadeia leve, onde as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305:537-539). Devido à seleção aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas diferentes de anticorpo, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. Procedimentos semelhantes são apresentados são apresentados na Publicação Internacional Nº WO 93/08829, e por Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) são fundidos a sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão, preferivelmente, dá-se com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte da articulação, regiões C_H2 e C_H3. É preferido ter uma primeira região constante de cadeia pesada (C_H1), contendo o local necessário para ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Ácidos nucleicos, com sequências que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se for desejado, de cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos nos vetores de expressão separados, e são co-transfetados num organismo hospedeiro adequado. Isto possibilita grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptido em formas de realização nas quais proporções desiguais das três cadeias de polipéptido usadas na construção proporcionam os resultados ideais. É possível, portanto, inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipéptido num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipéptido em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm significância específica.

Num exemplo desta abordagem, os anticorpos biespecíficos possuem uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com a primeira especificidade de ligação num braço, e um par híbrido de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações não desejadas de cadeia de imunoglobulina, visto que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona uma maneira fácil de separação (Publicação Internacional N° WO 94/04690).

Para pormenores adicionais para gerar anticorpos biespecíficos veja-se, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210; Rodrigues *et al.*, 1993, *J. of Immunology* 151:6954-6961; Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:163-167; Carter *et al.*, 1995, *J. of Hematotherapy* 4:463-470; Merchant *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681. Através da utilização destas técnicas, anticorpos biespecíficos podem ser preparados para utilização no tratamento ou prevenção de doença conforme definido no presente documento.

Anticorpos bifuncionais são também descritos, na Publicação de Patente Europeia N° EPA 0 105 360. Conforme apresentado nesta referência, anticorpos híbridos ou bifuncionais podem ser derivados tanto biologicamente, isto é, por técnicas de fusão de célula, quanto quimicamente, especialmente com agentes de reticulação ou reagentes formadores de ponte de bissulfeto, e podem compreender anticorpos inteiros ou fragmentos dos mesmos. Métodos para obtenção destes anticorpos híbridos são apresentados, por exemplo, na Publicação Internacional WO 83/03679, e Publicação de Patente Europeia N° EPA 0 217 577.

O anticorpo pode ser um fragmento funcionalmente ativo, derivado ou análogo de um anticorpo que se liga

imunoespecificamente a antígenos de célula cancerígena, antígenos virais, ou antígenos microbianos ou outros anticorpos ligados a células tumorais ou matrizes. Com relação a isto, "funcionalmente ativo" significa que o fragmento, derivado ou análogo é capaz de extrair anticorpos anti-anti-idiotipos que reconhecem o mesmo antígeno que o anticorpo do qual o fragmento, derivado ou análogo é derivado reconhecido (SIC). Especificamente, numa forma de realização exemplar a antigenicidade do idiótipo da molécula de imunoglobulina pode ser aumentada pela deleção de estrutura e sequências CDR que sejam de terminal C para a sequência CDR que especificamente reconhece o antígeno. Para determinar quais sequências CDR se ligam ao antígeno, péptidos sintéticos contendo as sequências CDR podem ser usados nas análises de ligação com o antígeno através de quaisquer métodos de análise de ligação conhecidos na técnica (por exemplo, a análise de núcleo BIA) (Veja-se, por exemplo, Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD; Kabat E. et al., 1980, *J. of Immunology* 125(3):961- 969).

Outros anticorpos úteis incluem fragmentos de anticorpos tais como, mas não limitados a, fragmentos $F(ab')_2$, que contêm a região variável, a região constante de cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada e podem ser produzidos por digestão de pepsina da molécula de anticorpo, e fragmentos Fab, que podem ser gerados pela redução das pontes de bissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$. Outros anticorpos são dímeros de cadeia leve de anticorpos, ou qualquer fragmento mínimo dos mesmos, tais como Fvs ou anticorpos de cadeia única (SCAs) (por exemplo, conforme descritos na Patente US N° 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883; e Ward et al. 1989, *Nature*, 334:544-54), ou quaisquer outras moléculas com a mesma especificidade que o

anticorpo.

Adicionalmente, anticorpos recombinantes, tais como anticorpos monoclonais quiméricos ou humanizados, que compreendem tanto porções humanas quanto não humanas, e que podem ser feitos usando técnicas de ADN recombinante padrão, são anticorpos úteis. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual porções diferentes são derivadas de diferentes espécies de animais, tais como aqueles que têm uma região variável derivada e regiões monoclonal de murino e constante de imunoglobulina humana. (Veja-se, por exemplo, Cabilly *et al.*, Patente US N° 4816567; e Boss *et al.*, Patente US N° 4.816397). Anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de espécies não humanas que têm uma ou mais regiões de determinação de complementação (CDRs) de espécies não humanas e uma região de estrutura de uma molécula de imunoglobulina. (Veja-se, por exemplo, Queen, Patente US N° 5.585.089). Estes anticorpos quiméricos e humanizados podem ser produzidos por técnicas de ADN recombinante conhecidas na técnica, por exemplo, usando métodos descritos na Publicação Internacional N° WO 87/02671; Publicação de Patente Europeia N° 184.187; Publicação de Patente Europeia N° 171496 Publicação de Patente Europeia N° 173494; Publicação Internacional N° WO 86/01533; Patente US N° 4816567; Publicação de Patente Europeia N° 12.023; Berter *et al.*, 1988, Science 240:1041-1043; Liu *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.* 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, Cancer Res. 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, Nature 314:446-449; e Shaw *et al.*, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Patente US N° 5225539; Jones *et al.*, 1986; Nature 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) Science 239:1534; e Beidler *et al.*, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Anticorpos completamente humanos são especificamente desejáveis e podem ser produzidos usando ratinhos transgênicos que sejam incapazes de expressar genes de cadeias leve e pesada de imunoglobulina endógena, mas que possam expressar genes humanos de cadeia leve e pesada. Os ratinhos transgênicos são imunizados da maneira normal com um antígeno selecionado, por exemplo, todo ou uma fração de um polipéptido da invenção. Anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos usando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humanos ancorados de ratinhos transgênicos são rearranjados durante a diferenciação de célula B, e subsequentemente sofrem mudança de classe e mutação somática. Dessa maneira, usando esta técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma análise desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos, veja-se Lonberg e Huszar (1995, Int. Ref. Immunol. 13:65- 93). Para uma discussão pormenorizada desta tecnologia para produção de anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para a produção destes anticorpos, veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806. Outros anticorpos humanos podem ser obtidos comercialmente, por exemplo, da Abgenix, Inc. (Freemont, CA) e Genpharm (San Jose, CA).

Anticorpos completamente humanos que reconhecem um epítipo selecionado podem ser gerados usando uma técnica referida como "seleção guiada". Nesta abordagem, um anticorpo monoclonal não humano selecionado, por exemplo, um anticorpo de ratinho, é usado para guiar a seleção de um anticorpo completamente humano que reconheça o mesmo epítipo. (Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899-903). Anticorpos humanos podem também ser produzidos usando várias técnicas conhecidas na técnica, incluindo bibliotecas de apresentação de fagos (Hoogenboom e Winter,

J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Quan, M. P. e Carter, P. 2002. The rise of monoclonal antibodies as therapeutics. Em Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu, P. M. e Fick Jr., R. B., eds., Marcel Dekker, Nova York, NY, Capítulo 20, páginas 427-469).

Noutros exemplos, o anticorpo é uma proteína de fusão de um anticorpo, ou um fragmento funcionalmente ativo do mesmo, por exemplo, no qual o anticorpo é fundido através de uma ligação covalente (por exemplo, uma ligação peptídica), tanto no terminal N quanto no terminal C para uma sequência de aminoácido de uma outra proteína (ou porção da mesma, preferivelmente uma porção com pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos da proteína) que não seja o anticorpo. Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento do mesmo é covalentemente ligado à outra proteína no terminal N do domínio constante.

Anticorpos incluem análogos e derivados que são modificados, isto é, pela união covalente de qualquer tipo de moléculas, contanto que esta união covalente permita que o anticorpo retenha sua imunoespecificidade de ligação ao antígeno. Por exemplo, mas não como uma limitação, os derivados e análogos dos anticorpos incluem aqueles foram adicionalmente modificados, por exemplo, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a uma unidade de anticorpo celular ou outra proteína etc. Qualquer uma das numerosas modificações químicas pode ser executada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a clivagem química, acetilação, formulação, síntese metabólica na presença de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o análogo ou derivado pode conter um ou mais aminoácidos não naturais.

Os anticorpos incluem anticorpos que têm modificações (por exemplo, substituições, deleções ou adições) nos

resíduos de aminoácidos que interagem com recetores Fc. Em especial, anticorpos incluem anticorpos que tenham modificações nos resíduos de aminoácidos identificados como envolvidos na interação entre o domínio anti-Fc e o recetor FcRn (veja-se, por exemplo, a Publicação Internacional N° WO 97/34631). Anticorpos imuno-específicos para antígeno de célula cancerígena podem ser obtidos comercialmente, por exemplo, da Genentech (São Francisco, CA) ou produzidos por qualquer método conhecido por aqueles especializados na técnica, tais como, por exemplo, técnicas de síntese química ou expressão recombinante. As sequências de nucleótido que codifica anticorpos imuno-específicos para um antígeno de célula cancerígena podem ser obtidas, por exemplo, do banco de dados GenBank ou de um banco de dados semelhante, de publicações da literatura, ou através de clonagem e sequenciamento de rotina.

Num exemplo específico, anticorpos conhecidos para o tratamento ou prevenção de cancro podem ser usados. Anticorpos imuno-específicos para um antígeno de célula cancerígena podem ser obtidos comercialmente ou produzido por qualquer método conhecido daqueles especializados na técnica, tal como, por exemplo, técnicas de expressão recombinante. A sequência de nucleótido que codifica anticorpos imuno-específicos para um antígeno de célula cancerígena pode ser obtida, por exemplo, do banco de dados GenBank ou de um banco de dados semelhante, de publicações da literatura, ou através de clonagem e sequenciamento de rotina. Exemplos de anticorpos disponíveis para o tratamento de cancro incluem, mas não se limitam a anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado, HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech) para o tratamento de pacientes com cancro de mama metastático; RITUXAN® (rituximab; Genentech) que é um anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico para o tratamento de pacientes com linfoma não Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) que é um anticorpo de murino para

o tratamento de cancro do ovário; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) que é um anticorpo IgG_{2a} de murino para o tratamento de cancro colorretal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY) que é um anticorpo quimérico anti-EGFR IgG para o tratamento de cancros positivos para fator de crescimento epidérmico, tais como cancro da cabeça e pescoço; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que é um anticorpo humanizado para o tratamento de sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA) que é um anticorpo IgG₁ humanizado para o tratamento de leucemia linfocítica crónica (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) que é um anticorpo IgG anti-CD33 humanizado para o tratamento de leucemia mieloide aguda (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) que é um anticorpo IgG anti-CD22 humanizado para o tratamento de linfoma não Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que é um anticorpo anti-HLA-DR humanizado para o tratamento de linfoma não Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA) que é um anticorpo anti-HLA-Dr10 de murino rádio marcado para o tratamento de linfoma não Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA) que um mAb anti-CD2 humanizado para o tratamento de Doença de Hodgkin ou linfoma não Hodgkin; Avastin (Genentech, Inc., CA) que é um anticorpo humanizado anti-VEGF para o tratamento de cancros de pulmão e colorretal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ e Amgen, CA) que um anticorpo anti-CD22 para o tratamento de linfoma não Hodgkin; e CEAcide (Immunomedics, NJ) que é um anticorpo anti-CEA humanizado para o tratamento de cancro colorretal.

Outros anticorpos úteis para o tratamento de cancro incluem, mas não se limitam a anticorpos contra os seguintes antigénios: CA125 (do ovário), C215-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa-fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorretal), fosfatase alcalina placentária (carcinomas), antigénio específico da próstata (próstata), fosfatase prostática ácida (próstata), fator de

crescimento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), recetor de antitransferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cancro de mama), CEA (colorretal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), recetor IL-2 (leucemia de célula T e linfomas); CD20 (linfoma não Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriônica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiplo), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), e produto oncogene Neu (carcinomas). Alguns anticorpos específicos úteis incluem, mas não se limitam a BR96 mAb (Trail, P. A., Willner, D., Lasch, S.J., Henderson, A. J., Hofstead, S.J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellström, I., Hellström, K. E., "Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates" Science 1993, 261, 212-215), BR64 (Trail, PA, Willner, D., Knipe, J., Henderson, A.J., Lasch, S.J., Zoeckler, M.E., Trailsmith, M.D., Doyle, T.W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G.R., Brown, J. P., Hofstead, S.J., (Greenfield, R.S., Firestone, R.A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellström, K. E., e Hellström, I. "Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates" Cancer Research 1997, 57 100-105, mAbs contra o antígeno CD-40, tal como S2C6 mAb (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegall, C. B., e Wahl, A. F. "Agonistic properties and *in vivo* antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14" Cancer Res. 2000, 60, 3225-3231), mAbs contra o antígeno CD70, tal como 1F6 mAb e 2F2 mAb, e mAbs contra o antígeno CD30, tal como AC10 (Bowen, M.A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., e Podack, E. R. "Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT" J. Immunol. 151, 5896-5906, 1993: Wahl et al., 2002 Cancer Res. 62(13):3736-42). Muitos outros anticorpos de internalização que se ligam aos

antigénios associados a tumores podem ser usados e foram analisados (Franke, A. E., Sievers, E. L., e Scheinberg, D. A., "Cell surface recetor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review" *Cancer Biother Radiopharm.* 2000, 15, 459-76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" *Semin Oncol.* 2000, 27, 64-70; Breitling, F., e Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley and Sons, Nova York, 1998).

Em certos exemplos, o anticorpo não é Trastuzumab (anti-HER2 de comprimento total, humanizado (PM 145167)), HerceptinF(ab')₂ (derivado de anti-HER2 enzimaticamente (PM 100000)), 4D5 (anti-HER de comprimento total, murino, de hibridoma), rhu4D5 (anticorpo humanizado de comprimento total, expressado de forma transiente), rhuFab4D5 (Fab humanizado recombinante (PM 47738)), 4D5Fc8 (antiHER2 de comprimento total, murino, com domínio de ligação FcRn com mutação), ou Hg (4D5 humanizado de comprimento total "Sem articulação", com cisteínas de articulação de cadeia pesada que sofreu mutação para serinas. Expresso em *E. coli* (portanto não glicosilado)).

Noutro exemplo específico, anticorpos conhecidos para o tratamento ou prevenção de uma doença autoimune são usados de acordo com as composições e métodos da invenção. Anticorpos imuno-específicos para um antigénio de uma célula que é responsável pela produção de anticorpos autoimunes podem ser obtidos que qualquer organização (por exemplo, uma universidade científica ou uma companhia) ou produzidos por qualquer método conhecido daqueles com especialização na técnica tais como, por exemplo, técnicas de síntese química ou expressão recombinante. Numa outra forma de realização, anticorpos úteis são imuno-específicos para o tratamento de doenças autoimunes, mas não se limitam a Anticorpo Antinuclear; Anti-ds ADN; Anti-ss ADN, Anticorpo Anticardiolipina IgM, IgG; Anticorpo Antifosfolípido IgM, IgG; Anticorpo Anti- SM; Anticorpo Antimitocondrial;

Anticorpo de Tiroide; Anticorpo Microsossómico; Anticorpo Tiroglobulina; Anti-SCL-70; Anti-Jo, Anti-U₁RNP; Anti-La/SSB; Anti SSA, Anti-SSB, Anticorpo Anticélulas Peritais; Anti-Histonas; Anti-RNP; C- ANCA; P-ANCA; Anticentrómero; Antifibrilarina, e Anticorpo Anti-GBM.

Em certos casos, anticorpos úteis podem ligar-se a um recetor ou a um complexo de recetor expresso num linfócito ativado. O recetor ou complexo de recetor pode compreender um membro da superfamília do gene imunoglobulina, um membro da superfamília do recetor TNF, uma integrina, um recetor de citocina, um recetor de quimiocina, uma proteína de histocompatibilidade principal, uma lectina, ou uma proteína de controlo de complemento. Exemplos não limitativos de membros da superfamília de imunoglobulina são CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, e ICOS. Exemplos não limitativos de membros da superfamília de recetor TNF são CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, e APO-3. Exemplos não limitativos de integrinas adequadas são CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 e CD104. Exemplos não limitativos de lectinas adequadas são lectina tipo C, tipo S, e tipo I.

Num exemplo, o Ligando liga-se a um linfócito ativado que está associado com uma doença autoimune.

Noutro exemplo específico, Ligandos imuno-específicos úteis para um antigénio viral ou microbiano são anticorpos monoclonais. Os anticorpos podem ser quiméricos, humanizados ou anticorpos monoclonais humanos. Conforme usado no presente documento, o termo "antigénio viral" inclui, mas não está limitado a, qualquer péptido viral, proteína de polipéptido (por exemplo, VIH gp120, VIH nef, RSV F glicoproteína, neuraminidase de influenza vírus, hemaglutinina de influenza vírus, HTLV tax, glicoproteína

de vírus herpes simples (por exemplo, gB, gC, gD, e gE) e antígeno superficial de hepatite B) que é capaz de obter uma resposta imunológica. Conforme usado no presente documento, o termo "antígeno microbiano" inclui, mas não se limita a, qualquer péptido microbiano, proteína, sacárido, polissacárido, ou molécula de lípido (por exemplo, uma molécula bacteriana, fúngica, protozoário patogénico, ou polipéptido de levedura incluindo, por exemplo, LPS e polissacárido capsular 5/8) que seja capaz de obter uma resposta imunológica.

Anticorpos imuno-específicos para um antígeno viral ou microbiano podem ser obtidos comercialmente, por exemplo, da BD Biosciences (São Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), ou Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) ou produzidos por qualquer método conhecido por aqueles especializados na técnica, tais como, por exemplo, técnicas de síntese química ou expressão recombinante. A sequência de nucleótido que codifica anticorpos que são imuno-específicos para um antígeno viral ou microbiano pode ser obtida, por exemplo, do banco de dados GenBank ou de um banco de dados semelhante, de publicações da literatura, ou através de clonagem e sequenciamento de rotina.

Num exemplo específico, Ligandos úteis são aqueles que são úteis para o tratamento ou prevenção de infecção viral ou microbiana de acordo com os métodos apresentados no presente documento. Exemplos de anticorpos úteis disponíveis para o tratamento de infecção viral ou infecção microbiana incluem, mas não se limitam a, SYNAGIS (MedImmune, Ind., MD) que é um anticorpo monoclonal de vírus sincicial anti-respiratório (RSV) humanizado útil para o tratamento de pacientes com infecção por RSV; PR0542 (Progenics) que é um anticorpo de fusão CD4 útil para o tratamento de infecção por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que é um anticorpo humano útil para o

tratamento de vírus de hepatite B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que é um anticorpo IgG₁ humanizado útil para o tratamento de citomegalovírus (CMV); e anticorpos anti-LPS.

Outros anticorpos úteis no tratamento de doenças infecciosas incluem, mas não se limitam a anticorpos contra os antígenos de estirpes patogênicas de bactérias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* (*Vibrio*) *fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratenum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp.), fungos patogênicos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); ou helmintos (*Enterobius vermicularis*,

Trichuris trichiura, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, e ancilostomas).

Outros anticorpos para o tratamento de doença viral incluem, mas não se limitam a anticorpos contra antígenos de vírus patogênicos, incluindo como exemplos e não com intuito limitativo: Poxviridae, Herpesviridae, Herpes Simplex vírus 1, Herpes Simplex vírus 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, vírus de influenza, vírus de parainfluenza, caxumba, sarampo, vírus sincicial respiratório, rubéola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, vírus da Hepatite A, vírus da Hepatite B, vírus da Hepatite C, vírus da Hepatite E, vírus da Hepatite não A/não B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, e Vírus da Imunodeficiência Humana.

Em tentativas para descobrir alvos celulares efetivos para diagnóstico de e terapêutica de cancro, pesquisadores buscaram identificar transmembrana ou, por outro lado, polipéptidos associados a tumor que fossem especificamente expressos na superfície de um ou mais tipos específicos de célula cancerígena, se comparado com uma ou mais células não cancerígenas normais. Frequentemente, estes polipéptidos associados a tumor são mais expressos de forma abundante na superfície das células cancerígenas se comparado com a superfície de células não cancerígenas. A identificação destes polipéptidos de antígeno de superfície celular associado com tumor fez surgir a capacidade para direcionar especificamente para células cancerígenas alvo para destruição através de terapêuticas baseadas em anticorpo.

Anticorpos que compreendem Ab na Fórmula **Ic** de conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) e que podem ser úteis no tratamento de cancro incluem, mas não se limitam a

anticorpos contra antígenos associados a tumor (TAA). Estes antígenos associados a tumor são conhecidos na técnica, e podem ser preparados para utilização na geração de anticorpos que usam métodos e informação que são bem conhecidos na técnica. Exemplos de TAA incluem (1) - (35), mas não se limitam a TAA (1) - (35) listados a seguir. Para conveniência, informação referente a estes antígenos, todos os quais são conhecidos na técnica, está listada a seguir e inclui nomes, nomes alternativos, números de acesso do Genbank e referências principais. Antígenos associados a tumor direcionados por anticorpos incluem todas as variantes de sequência de aminoácido e isoformas que possuam pelo menos cerca de 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, ou 95 % de identidade de sequência em relação às sequências identificadas nas sequências correspondentes listadas (SEQ ID NOS: 1-35) ou nas sequências identificadas nas referências citadas. Em alguns exemplos, TAA que têm variantes de sequência de aminoácido exibem substancialmente as mesmas propriedades biológicas ou características que um TAA que a sequência encontrada nas sequências correspondentes listadas (SEQ ID NOS: 1-35). Por exemplo, um TAA que tem uma sequência variante geralmente é capaz de se ligar especificamente a um anticorpo que se ligue especificamente ao TAA com a sequência correspondente listada. As sequências e apresentações especificamente citadas no presente documento são expressamente incorporadas por referência.

Antígenos Associados a Tumor (1) - (35):

(1) BMPR1B (recetor de proteína morfogenética óssea do tipo IB, N° de acesso do Genbank NM_001203, ten Dijke, P., et al. Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); documento WO 2004063362 (Reivindicação 2) WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento US 2003134790-A1 (Páginas 38-39); documento WO 2002102235 (Reivindicação 13; Página 296); documento WO

2003055443 (Páginas 91-92; documento WO 200299122 (Exemplo 2; Páginas 528-530); documento WO 2003029421 (Reivindicação 6); documento WO 2003024392 (Reivindicação 2, Figura 112); documento WO 200298358 (Reivindicação 1; Página 183); documento WO 200254940 (Páginas 100-101); documento WO 200259377 (Páginas 349-350); documento WO 200230268 (Reivindicação 27; Página 376); documento WO 200148204 (Exemplo; Figura 4) NP_001194 recetor de proteína morfogenética óssea, tipo IB/pid=NP_001194.1 - Referências Cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; NM_001203_1 502 aa

```

MLRSAGKLVGTKKEDGESTAFTFRPKYLACKCHHCFEDSVNNICSTGTCFTNIEED
DSGLPVVTSQCICLGESDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNEDLNFTLPFLNRDFVO
GPIHHRALLISVTVCSTLLLVLIILPCYFRYKQGETRFRYSIGLEQDETYIPPGESLRDLI
EQSQESGSGSGLFLLVQRTIAKQIQMVKQICKORYGEVVMCKNRGEKVAVKVFFTTEAS
WFRTEIYQTVLMRRHENILGFIAADIKUTGENTQLYLIITDYHENGSLYDYLKSTTLOAKS
MLKLAYSQVSGGLCHLITEIFSTQGEFAIAHROLKSKNILLVKKNGTCCIAIDLGLAVKFTSD
TNEVDIIPNTRVGTGRYMPPEVLDESINRNNHFQSYIMADMYSGLLIWEVARRCVSGGIV
EEYQLFYNHLVPSDFSYEDMREIVCIEKLAPSPFNWSSDECLRQMCKLMTQWANNPAS
RLTALNVKKTIAKMEESQDIKL

```

(SEQ ID NO: 1)

(2) E16 (LAT1, SLC₇A5, N° de acesso do Genbank NM_003486); Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H. W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273); documento WO 2004048938 (Exemplo 2); documento WO 2004032842 (Exemplo IV); documento WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento WO 200278524 (Exemplo 2); documento WO 200299074 (Reivindicação 19); páginas 127-129); documento WO 200286443 (Reivindicação 27; Páginas 222, 393); documento WO 2003003906 (Reivindicação 10; Página 293); documento WO 200264798 (Reivindicação 33; Páginas 93-95); documento WO 200014228 (Reivindicação 5; páginas 133-136); documento US 2003224454 (Figura 3);

documento WO 2003025138 (Reivindicação 12; Página 150); NP_003477 família de portador de soluto 7 (portador de aminoácido catiónico, sistema y^+), membro 5/pid=NP_003477.3 - Referências cruzadas de *Homo sapiens*: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1 507 aa

```

MRGAGPKRRALAAPAAEKEEAREENLAAKSADGSAFAGEGEGVTLQRNITLLINGVAITV
GTLIGSGIFVYPTQVLKEAGSPGLALVWAAACGVFSIVGALCYAELGTTIEXSGGDYAYN
LEVYGSLEFAPLEKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLPFTCPVPPEAAKLVACLVL
LLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALALITLLGFVQIQKGVVSHLDPNFSFQETKLDV
GNIVLALYSGLFAYQGNBYLNFVTEEMINPYENLPLAIIISLPITVLVYVLTNLAYFTTL
STEOMLSSEAVAVDFQNYHLGVMSWIIIPVFFVGLSCFQSVNGSLFTSEHLFFVGSRECHLF
SILSMINPQLLTPVPSLVFTCYNTLLYAFSEKIDFSEVINFFSFNNMLCVALAIIQMINLKH
RKPELERPIKYNLALPVFFILACLPLIAVSPWKTFFVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWHEX
KPKWLLQGIFSTTVLCQELMQVVPQET

```

(SEQ ID NO: 2)

(3) STEAP1 (seis antigénios transmembrana epitelial da próstata, N° de acesso do Genbank NM_012449); Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (25) 14523-14528); documento WO 2004065577 (Reivindicação 6); documento WO 2004027049 (Figura 1L); EP 1394274 (Exemplo 11); documento WO 2004016225 (Reivindicação 2); documento WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento US 2003157089 (Exemplo 5); documento US 2003185830 (Exemplo 5); documento US 2003064397 (Figura 2); documento WO 200289747 (Exemplo 5; Páginas 618-619); documento WO 2003022995 (Exemplo 9; Figuras 13A, Exemplo 53; Página 173, Exemplo 2; Figura 2A); NP_036581 seis antigénios epiteliais de transmembrana da próstata Referências Cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1 339 aa

MESKEDITNQSELWOMKPRENLEEDYLHKDTGETENLKEPVLALHQTANADEFCPSE
LQHTQELFPQWHLPIKIAATIASLTFLYTLREVINPLATESQQYFYKIFILVINEVLPW
VSITLLALVYLPQVIAAIVQLHNGTKYKFFPHMLDKWMLTREQPGILLGFFFAVLHAIYSL
SYPMRRSYRYKLINWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS
VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTHALIFANNHMDIKQFWYTPPTFMIAVFLPIV
VLIPKILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL

(SEQ ID NO 3)

(4) 0772P (CA125, MUC₁₆, N° de acesso do Genbank AF361486); J. Biol. Chem. 276 (2(:27371-27375 (2001)); documento WO 2004045553 (Reivindicação 14); documento WO 200292836 (Reivindicação 6; Figura 12); documento WO 200283866 (Reivindicação 15; Páginas 116-121); documento US 2003124140 (Exemplo 16); documento US 2003091580 (Reivindicação 6); documento WO 200206317 (Reivindicação 6; Páginas 400- 408);

Referências Cruzadas: G1:34501467; AAK74120.3;
AF361486_1

6995 aa

FVTSLLTPGLVITTDMMGLSREPQTSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTTEAMQPSTHTAVT
 NVRTSISGHESQSSVLSDSSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIOIEPTSSL
 TSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPFGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTISPDIS
 TEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSHS
 EMTTLMSTRTPGDVFWPPLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSTFFSTLPESISSSPHPVTALL
 TLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSNTPVVNVGTVI
 YKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATSTLGNSTSVSTSTPAPPETMMTQPTSSLTSGLREIS
 TSQETSSATERSASLSGMPGTGATTKVSRTEALSLGRSTSTPGPAQSTISPEISTETITRIS
 TPLTTTGSAMTITPKTGHSGASSQCTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSR
 GPEDVSWPSPRPSVEKTSPPSSLVLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLEFTVMMKT
 TDMLDTSLEPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETRAIQLSSENTAVTQMGTISARQEFYS
 SYPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIH
 SATKPSSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSRRGPPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTES
 TEMTITTTQTSFGATSRGTLLDSTTTFMSTGTHSTASQGFSSQMTALMSRTFGEVPWLS
 HPSVERASSASPSLSSPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKFTTELLGTSSE
 PETSSPPNLSSTSAEILATTEVTTDTTEKLEMTNVVTSCYTHESPSSVLADSVTTKATSSM
 GITYPTGDTNVLSTPAFSDTSTRIOKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSVPPT
 GATTEVSRTEAIISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPS
 GATSQGTFTLDSSTASWPGTHSATQRFPRSVVTPMSRGPEVSWPSPSVEKNSPPS
 SLVSSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVVVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNI
 TSDESLAASKATTETRAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSPKVISPVVTSSS
 IHDMMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPLGLRETRTSQDITSSTETSTVLYKMPSGATPE
 VSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTTQGYSLATSQ
 VTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMNLMSRGPELSWTSPRFVETTRSSSSSLTSLP
 LTTSLSPVSSSTLLDSSPSSPLFVTSLLPLGLVKTTTEVLDTSEPKTSSSPNLSSTSVELP
 ATSEIMTDTEKIHPSNNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVEDTV

FTSNPAFSETARIPTEPTFSLTPGFRSTSTSEETTSITETSAVLFGVPTSATTEVSMTEI
 MBSNRTHIFDSQSTMSPDIIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTTQKSSPGATAQSTLTIA
 TTTAFLARTHSTVPFRFLHSEMTTLMGRSPENPFWKSSPFVEKTSSSSSLLSLPVTTSFS
 VSSTLPQSIPSSSFVTSLLTPGMVKITDSTSTFGTSLSPNLSGTSVEILAASEVTIDTE
 KIHPSMAVTNVGTTSSCHELYSSVSIHSEPSKATYPVGTTPSSMAETSISTSMANFET
 TGFEAEPPSHLTSGLRKTNMSLDTSSVTPTNTFSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDW
 PPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESGTITSFPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETIS
 TGTVMPSLSEAMTSFATTGVFRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSSTPVFPSS
 STFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSSTEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSS
 PILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIFNEAAHROGIRPVKGQQT
 STSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGLTLPNMQ
 MASTIPTEMMITTPYVFPDVPETTSLSLTSGLAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVS
 SGAERSPVIOQTLDVSSSEPDTTASWVHPAETIPTVSKITPNFFHSELDTVSESTATSHGA
 DVSSAIPITNISPSSELDALTPLVTISGTDSTTFTPLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSIT
 PRTIPNFSHSHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGARDLVTSQVTSSGTDNRMTIPT
 LTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSAPITSTISPAVSRLVTSMTVSLAAKTSTTHRALTNS
 PGEFATTVSLVTHSAQTSPTVPWTTSIFFHKSDDTTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEV
 PGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGHEASSAIPPTVSPGVPGVV
 TSLVTSSRAVSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS
 SRAVSTTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPVPGVVTSLVTSSSGVNS
 TSIPTLILSPGELETTTPMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSRAVSTTIP
 ILTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPVPGMVTFVLVTSSRAVSTTIPTLTIS
 DEFEPTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPVQGLVTSLVTSSSGSETSAFNLTVASSQPET
 IDSWAHFGTEASSVVPTLTVSTGEPTTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSSHSELDTMPS
 TVTSPAESSSAISTTISPGIFGVLTSLVTSSGRDISATPTTVSPESPRESEATASWVTHP
 AVTSTTVPTTENYSHSEPDTPSLATSPGAETSDFTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTD
 TSITITPLTLSSGEPETTTSTITYSEHTSSAIPTLFVSPDASKMLTSLVISSGTDSTT
 FPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKPSHKSDDTLPVAITSPGPEASSAVS
 TTTISPDMSDLVTSLVSSGTDSTTFTPLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPN
 FSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGVPTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDSTAIPTLTPSPG
 EPETTASSATHFGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTHASWVTHPPQTSTPVSRTTSSFSHSSPD
 ATPVMATSPRTEASSAVLTITSPGAFEMVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALL
 STHPRTETSKTEFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVTGTSRVD
 LSPTAGPGVSAKTAFLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLT
 VSPAVSGLSSASITTDKPTVTSMWTETSPSVTSVGPPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPP
 KTSHGEGVSPPTILRTTMVEATNLATGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLA
 SESVTSRSTSYNHRSWISTSSYNRRYWPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSTAATVPFMV
 PFTLNFTITNLQYEEDMRHPSGRKFNATERELQGLLKPLERNSSLEYLYSGCRLASLRPE
 KDSSATAVDAICTHREDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHR
 SSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLMPTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRK
 FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRFEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLN
 REQLYWELSKLINDIERLGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTSTPGTSTVDLRTSGTPSS
 LSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPFKNTSVG
 PLYSGCRLTSLASEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNRRERLYWELSQLTNGIKELGPYT
 LDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLGTSGTPPSLSPATAGPLLVLFTLNFTITN

LKYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQTLVGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDA
 ICTHRLDPKSPGVDRQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHNIFVPTSSTPG
 TSTVDLGSGTPSSLPSEPTSATAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTTERVLQ
 SLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQLYWEL
 QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSEPTSAGP
 LLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTTERVLQGLLGPMPFKNTSVGLLYSGCRLTLL
 RPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGF
 THRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSEPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPG
 SRKFNTTTERVLQGLLGPMPFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLNPSQSP
 GLDRQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTSTPTSTVDLGTSGT
 PSPVPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLSPIFKNSSV
 GPLYSGCRLTSLRPEKDGAATGMDAVCLYHFNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPY
 SLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPGTSTVYWAFTGTPSSFPGHTEPGPLLIPFTNFPTIT
 NLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKQEAATGVD
 TICTHRVDPGPGLDREQLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNWSSVPTTSTP
 GTSTVHLATSGTPSSLPGHTEAPVPLLIPFTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQ
 GLLKPFLKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKHGAATGVDAICTLRDPTGPGLDREQLYWEL
 QLTNSVTELGPHYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTPGTSAVHLETSGTPASLPGHTEAPGP
 LLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPFLKSTSVGPLYSGCRLTLL
 RPEKGAATGVDTICTHRLDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGF
 THRNFPVPTSTPGTSTVHLGTSETPSSLPRIVPGLLVPFTLNFTITNLQYERAMRHPG
 SRKFNTTTERVLQGLLPLFKNTSIGPLYSSCRLTLLRPEKDKAATRVDAICTHHPDPQSP
 GLNREQLYWELSQLTHGITELGPHYTLDRDSLYVDGFTHWSPITSTPGTSTVNLGTSGI
 PPSLPETTATGPLLVPFTLNFTITNLQYENMHPGSRKFNTTTSVLQGLLKPFLKSTSV
 GPLYSGCRLTLLRPEKDGATRVDAICTHRPDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPY
 TLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPATGPFVLLPFTLNFTII
 NLQYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLMPFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRV
 AVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPHYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTF
 DTSTMHLATSRTFASLSGPTTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTTERVLQ
 GLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATKVDAICTYRDPKSPGLDRQLYWEL
 QLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASP
 LLVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLRSFLKSTSVGPLYSGCRLTLL
 RPEKDGATGVDAICTHHPDPKSPRLDRQLYWELSQLTHNITELGPYALDNESLNVNGF
 THRSSVSTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGS
 RKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPGPG
 LDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTI
 NNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSILGARYTGCRVIALRSVKNGAETRV
 DLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSQLTHGITRLGPYSLDRDSLYVNGYNEPGPDEPPTT
 PKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTNFTISNLQYSPDMGKSATFNSTEGVLQHLRLP
 LFQKSSMGPFYLGCCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHG
 VTQLGPHYVLDRLSLFINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPSTSEYITLLRDIDQ
 KVTTLKYGSQHLDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLPPLVEQVFLDKTLNASFHW
 LGSTVQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHLYLFTITNLFPYSQDKAQPGTTNYQNRKN
 IEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRRHETGVDSL CNFSP LARRVDRVAIYEEFL
 RMTNRNGTQLQNFLLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLIC

GVLVTTTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSQSHLDLEDLQ

(SEQ ID NO:4)

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, fator de potencialização de megacariócito, mesotelina, N° de acesso do Genbank NM_005823); Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269(2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (20): 11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); documento WO 2003101283 (Reivindicação 14); documento WO 2002102235 (Reivindicação 13; Páginas 287-288); documento WO 2002101075 (Reivindicação 4; Páginas 308-309); documento WO 200271928 (Páginas 320-321); documento WO 9410312 (Páginas 52-57);

Referências Cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

622 aa

**MALPTARPLLGSCTPALQSLLFLFSLGWVQPSRTLAGEYQEAAPLDGVLNPPNLS
LSPRQLLGFPCAEEVSGLSTERVRELAVALAQKNVLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRIIPALACWGVRSLLSEA
DVRLGGLACDLFGRFVAESAEEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPPSTW
SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAANRQRSSRDPSNRQPRTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLIIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIFPTYEQLDVLKHKLDELY
PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLTLEALLEVNKGHEMSFQVATLIDRFVK
GRGQLDKDTLDTLTAFTPGYLCSLSPHEELSSVFPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA
RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQONVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVASVQ
KLLGPHVEGLKAEEHREVRDNLIRQRQDDLDLGLGLQGGIPNGYLVLDLSNQEALSGT
PCLLGPGPVLTVLALLASTLA**

(SEQ ID NO:5)

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1lb, SLC₃₄A2, família do veículo de soluto 34 (fosfato de sódio), membro 2, portador de fosfato dependente de sódio do tipo II 3b, N° de acesso do Genbank NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002); Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J. A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); documento WO 2004022778 (Reivindicação 2); EP 1394274 (Exemplo 11); documento WO 2002102235

(Reivindicação 13; Página 326); EP 875569 (Reivindicação 1; Páginas 17-19); documento WO 200157188 (Reivindicação 20; Página 329); documento WO 2004032842 (Exemplo IV); documento WO 200175177 (Reivindicação 24; Páginas 139-140);

Referências Cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

690 aa

MAPNPGLGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTONTTEAPVTKIRLLPSYSTATLI
DEPTEVDDPWNLP TLQDSGIKNSERDTKGKILCFFQGIQRLIILLGFLYFFVCSLDILSS
APQLVGGKMAQQPFSNSSIMSNPLLGVLVIGVLVTVLVQSSSTSTSIVVSMVSSSLTVRA
AIPPIINGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFFNLSVLVLLPVEVATHY
LEIITQLIVESPFRKNGEDAPDLLKAVITKPFTRLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKS LVK
INCKTFPNTQTQINVTVPSTANCTSPSLCWTGDIQNWIMKNVTYKENIARQHIFFVNFHLP
DLAVGTILLILSLVLGCLIMIVKILGSLVKGQVATVIKKTINTDFPFPFAWLTGYLAI
LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLTLGSGNIGTTTTAILAALASPGNA
LRSSLQIALCHFFFNISGILLNYPPIPTRLPIRMAGLGNISAKYRWFVAVFYLIIFFFLI
PLTVFGLSLAGWRVLVGUGVFPVFIIILVLCRLQLQSRCPRVLPKKLQNNFPLPLMRS
KPWDAVVSFKFTGCFQMRCCYCCRVCCRACCLCGCPKCCRCCKCEDLERAQEGQDVPVK
APETFDNITISREAQGEVFPASDSKTECTAL

(SEQ ID NO:6)

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, domínio sema, sete repetições de tromboespondina (tipo 1 e semelhante ao tipo 1), domínio de transmembrana (TM) e domínio citoplasmático curto, (semaforina) 5B, N° de acesso do Genbank AB040878); Nagase T, et al. (2000) ADN Res. 7 (2):143-150); documento WO 2004000997 (Reivindicação 1); documento WO 2003003984 (Reivindicação 1); documento WO 200206339 (Reivindicação 1; Página 50); documento WO 200188133 (Reivindicação 1; Páginas 41-43, 48-58); documento WO 2003054152 (Reivindicação 20); documento WO 2003101400 (Reivindicação 11); Acesso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

1093 aa

MVLGFLAVSLLLPSLTLLVSHLSSSQDVSSEPSSEQQLCALSKHPTVAFEDLQFWVSNF
 TYFGARDFSQLALDPGQNLIVGARNYLFRLLSLANVSLIQATEWASSEDTRRSQSKGKT
 EEECONYVRVLIVAGRKVFMCSTNAFSPNCTSRQVGNLSRTTEKINGVARCPYDPRHNT
 AVISSQGELYAATVIDFSGRDPAIYRSLGSGPFLRTAQYNSKMLNEPNFVAAYDIGLFAY
 FFLRENAVEHDCGRTVYSRVARVCKNDVGGRFLLDTWTFMKARLNCSPGEVPPFYNE
 LQSAFHLPEQDLIYGVTTFVNSIAASAVCAFNLSAISQAFNGPFRYQENFRAANLPIAN
 PIPNFQCGTLPETGPNENLTERSLQDAQRLFLMSEAVQPVTPPCVTQDSVRFSLVVDL
 VQAKDTLYHVLYIGTESGTLKALSTASRSLHGCYLEELHVLPPGRREPLRSLRILHSAR
 ALFVGLRDGVLRVPLERCAAYRSQGACLGARDPYCGWDGKQQRCTLEDSSNMSLWTQNI
 TACPVNRVTRDGGFGFWSPWQPCHELDGDNSSGSCLCRARSCTSPFRFCGGDLCLGPAIHT
 ANCSRNGAWTPWSSWALCSTSCGIGFQVRQRSCSNPAPRHGGRICVGSREERFCNENTP
 CPVPIFWASWGSWSKCSSNCGGGMQSRRRACENGNSCLGCGVEFKTCNPEGCPFEVRRNTP
 WTPWLFPVNVTOGGARQEQRFRFTCRAPLADPHGLQFGRRRTETRTCPADGSGSCDTBALV
 EDLLRSGSTSPHTVSGGWAAGFWSSCSRDCELGFRVRKRTCTNPEPRNGGLPCVGDAAE
 YQDCNPQACFVRGANSWTSWSPCSASCGGGHYQRTSCTSPAPSPGEDICLGLHTEAL
 CATQACPEGWSPWSEWSKCTDDGAQSRSRHCEELLPGSSACAGNSSQSRPCFYSEIFVIL
 PASSMERATGCAGFNLIHLVATGISCFLGSGLLFLAVYLSQHCQRQSQESTLVHPATPN

HLHYKGGTTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRANFYPLQQTNVYTTTTYPSPLNKHSPR
 PEASPGQRCFPNS

(SEQ ID NO:7)

(8) PSCA hlg (gene de 2700050C₁₂Rik, C₅₃0008016Rik, ADNc de RIKEN 2700050C₁₂, ADNc de RIKEN 2700050C₁₂, N° de acesso do Genbank AY358628); documento US 2003129192 (Reivindicação 2); documento US 2004044180 (Reivindicação 12); documento US 2004044179 (Reivindicação 11); documento US 2003096961 (Reivindicação 11); documento US 2003232056 (Exemplo 5); documento WO 2003105758 (Reivindicação 12); documento US 2003206918 (Exemplo 5); EP 1347046 (Reivindicação 1); documento WO 2003025148 (Reivindicação 20); Referências Cruzadas: G1:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

141 aa

MNVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMQKEVME
 QSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSPCSPGKLSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSASA
 LRPGLRTTILFLKLALFSAHC

(SEQ ID NO:8)

(9) ETBR (recetor endotelina tipo B, acesso Genbank N° AY275463); Nakamuta M., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., *et al.* Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307; 1992; Arai H., *et al.* J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto, A., Yanagisawa M., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N. A., *et al.* J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B, *et al.* J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., *et al.* Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., *et al.* Biol. Chem. 272, 21589-21596; 1997; Verheij J.B., *et al.* Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., *et al.* Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., *et al.* Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T, *et al.*, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., *et al.* Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., *et al.*, Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., *et al.*, Nat. Genet. 12, 445- 447, 1996; Svensson P.J., *et al.* Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., *et al.* Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., *et al.* (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; documento WO 2004045516 (Reivindicação 1); documento WO 20040489938 (Exemplo 2); documento WO 2004040000 (Reivindicação 151); documento WO 2003087768 (Reivindicação 1); documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento WO 200261087 (Figura 1); documento WO 2003016494 (Figura 6); documento WO 2003025138 (Reivindicação 12; Página 144); documento WO 200198351 (Reivindicação 1; Páginas 124-125); EP 522868 (Reivindicação 8; Figura 2); documento WO 200177172 (Reivindicação 1; Páginas 297-299); documento US

2003109676; documento US 6518404 (Figura 3); documento US 5773223 (Reivindicação 1a; Col. 31-34); documento WO 2004001004;

442 aa

**MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRINWGEERGFFPDRA TP LLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNA
SLARSLAPAEVPRGDRTAGSPPR TISPPPCQGP I EIKETFKYINTVVSCLVFVLGIIGNS
TLRLIYYKNCMRNGPNILIASLALGDLHIVIDIPIN VYKLLAEDWPF GAEMCKLVPFI
QKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVSVVLAVPEAIGF
DIITMDYKGSYLRIICLLHPVQKTAFMQFYKTAKDWNLF SFYFCLPLAITAFFYTLMTCEM
LRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVFCLVLV FALCNLPLHL SRILKLTLYNQNDPNRCEL
LSFLLVLDYIGINMASLNSCINPLALYLVS KRFKNCFKSC LCCWCQSFE EKQSLEEKQSC
LKPKANDHG YDNFRSSNKYSSS**

(SEQ ID NO:9)

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acesso do Genbank NM_017763); documento WO 2003104275 (Reivindicação 1); documento WO 2004046342 (Exemplo 2); documento WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento WO 2003083074 (Reivindicação 14; Página 61); documento WO 2003018621 (Reivindicação 1); documento WO 2003024392 (Reivindicação 2; Figura 93); documento WO 200166689 (Exemplo 6);

Referências Cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1

783 aa

MSGGHQLQLAALWFWLLMATLQAGFCRTGLVLA AAVESERSAEQKAIIEVIPLKMDPTGK
 LNLTLLEGVFAQVAREITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFTISIVKLESFRRAPRCL
 SLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQQLQQLGLTWPVVLIWGNDAEKIMEFVYKNQ
 KAHVRIELKEPPAWPDYDVWILMTVVGTFVIIASVLAIRCRPRHSRFDPLQORTAWAI
 SQLATRRYQASCRQARGENWPDSSGSSCSAPVCAICLEEFSEGQELVISCLHEFHRCVD
 FWLHQHRTCPLCVFNITEGDSFSQSLGFSRSYQEPGRRLHLIRQHPGHANYHLPAAYLLG
 PERSAVARPPRPDPFLPSQEPGMPRHRFPRAAHPRAPGQQRLAQAHFYAQGNWMSH
 LQSTSQHPAACPVPLRRARPPDSSGSGESYCTERSGYLADGPASDSSSGPCHGSSSDSVV
 NCTDISLQGVHSGSSSTFCSSLSDDFDELVYCSPKGDPQRVDMQPSVTSRPRSLDSVVP TG
 ETQVSSHVHYHRHRHHHYKKRPQWNGRKPGPETGV PQSRPPIFRTQPQPEFPSPDQQVTG
 SNSAAPSGRLSNPQCPRALPEPAPGPVDASSICPSTSSSLFNLOKSSLSARHPQRKRGGP
 SEPTFGSRPQDATVHPACQIFPHYTPSVAYPWSPEAHFLICGPPGLDKRLLPETPGPCYS
 NSQPVWLCLTPRQPLBPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCFYPHCQVLSAQPGSEEEELCE
 QAV

(SEQ ID NO:10)

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gene 1 associado com cancro da próstata, proteína 1 associada com cancro da próstata, seis antígenos de membrana epitelial de próstata 2, seis proteínas de membrana da próstata, N° de acesso do Genbank AF455138; Lab. Invest. 82 (11):1573:1582 (2002)); documento WO 2003087306; documento US 2003064397 (Reivindicação 1; Figura 1); documento WO 200272596 (Reivindicação 13; Página 54-55); documento WO 200172962 (Reivindicação 1; Figura 4B); documento WO 2003104270 (Reivindicação 11); documento WO 2003104270 (Reivindicação 16); documento US 2004005598 (Reivindicação 22); documento WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento US 2003060612 (Reivindicação 12; Figura 10); documento WO 200226822 (Reivindicação 23; Figura 2); documento WO 200216429 (Reivindicação 12; Figura 10);

Referências Cruzadas: G1:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

490 aa

MESISMGSPKSLSETVLFNGINGIKDARKVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVWIGS
 RNPKFASERFFPHVVDVTHHEDALTKTNIFVVAIHREHYTSLWDLRHLLVGKILIDVSNM
 RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSANALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIE
 LARQLNFIPIDLGSLSSAREIENLPLRLFTLNRGPFVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYA
 RNQOSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLLSLVYLALGLLAAAYQLYVGTKYRRFPFWLETWLQ
 CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSCLPFMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEEVNRIMY
 ISFGIMSLGLLSLLAVTSIPSVSNALNWRFSFIQSTLGYVALLISTPHVLIYGNKRAFE
 EYYRFFYTPPNFVLALVLPISIVILGKIILFLPCISQKLKRIKKWEKSQFLEEGIGGTIP
 HVSPERVTVM

(SEQ ID NO:11)

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de
 catião potencial de recetor transiente, subfamília M,
 membro 4, número de acesso do Genbank NM_017636); Xu,
 X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (19): 10692-
 10697 (2001); Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol.
 Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); documento US
 2003143557 (Reivindicação 4); documento WO 200040614
 (Reivindicação 14; Página 100- 103); documento WO
 200210382 (Reivindicação 1; Figura 9A); documento WO
 2003042661 (Reivindicação 12); documento WO 200230268
 (Reivindicação 27; Página 391); documento US 2003219806
 (Reivindicação 4); documento WO 200162794 (Reivindicação
 14; Figuras 1A-D);

Referências Cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2;
 NM_017636_1
 1214 aa

MVVPKEEQSWIPKIFKKKTCTTFFIVDSTDPGGTLCQGRPRTAHPAVAMEDAFGAAVTV
 WSDAHTTEKPTDAYGELDFTGAGRKHSNFIRLSDRTDPAAVISLVTRTWGFRAPNEVVS
 VLGGSGGPFVLQTLQDILLRGLVRRAAQSTGANIVTGGLHTGIGRHVGVAVRDHQMSTGG
 TKVAVMGVAPWGVVVRNRTLINPKGSFPARYRNRGDPEDGVQFPLDYNYSAFFLVDGTH

GCLGGENRFRLELESYISQKQKTVGGTGIDIPVLLLLIDGDEKMLTRIENATQAQLPCLL
 VAGSGGAADCLAETLEDTLAPGSGGARQGEARDRIIRFFPKGDLEVLQAQVERIMTRKEL
 LTVYSSSEDGSEEFETIVLKALVKACGSSEASAYLDELRLAVANNRVDIAQSELFRGDIQW
 RSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLLIHGLSLGHFLTPMRLAQLYSAAPSNLIHNLDDQA
 SHSAGTKAPALKGGAELRPPDVGHVLRMLLGKMCAPRYPSGGANDPHPGQGFGESMYLL
 SDKATSPLSLDAGLQAPWSDLLWALLLNRAQMAMFWEMGSNAVSSALGACLLLRVMA
 RLEPDAEEAARRKDLAFKFEKMGVLDLFGECYSSEVRAARLLLRRCPLWGDATCLOLQAMQ
 ADARAFFAQDGVQSLLTQKWWGDMASTTPIWALVLAFFCPPLIYTRLITFRKSESEPTRE
 ELEFDMDSVINGEGPVGTADPAEKTPLGVPRQSGRPGCCGGRCGGRCLRRWFHFWGAPV
 TIFMGNVVSYLLFLLLSRVLLVDFQPAPPGSLLELLLYFWAFTLLCEELRQGLSGGGGSL
 ASGGPGPGHASLSQRRLYLADSWNQCDLVALTCFLLGVGCRLTGGLYHLGRTVLCIDFM
 VFTVRLLIHFTVNKQLGPKIVIVSKMMKDVFFLFFLGVLVAYGVATEGLLRPRDSDFP
 SILRRVFRPYLQIFGQIQEDMDVALMEHSNCSSEPGFWAHPPGAQAGTCVSQXANWL
 VLLLVIFLLVANILLVNLIIAMFSYTFGKVQGNSDLYNKAQRYRLIREPHSRPALAFFPI
 VISHLRLLLRQLCRRRPSFPQSSPALEHFRVYLSKEAERKLLTWESVHKENFLARARDK
 RESDSERLKRTSQKVDLALKQLGHIREYQRLKVLEREVQQCSRVLGWVAEALSRSALLP
 PGGPPPPDLPGSKD

(SEQ ID NO:12)

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, fator de crescimento derivado de teratocarcinoma, N° de acesso do Genbank NP_003203 ou NM_003212),

Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); documento US 2003224411 (Reivindicação 1); documento WO 2003083041 (Exemplo 1); documento WO 2003034984 (Reivindicação 12); documento WO 200288170 (Reivindicação 2; Páginas 52-53); documento WO 2003024392 (Reivindicação 2; Figura 58); documento WO 200216413 (Reivindicação 1; Páginas 94-95, 105); documento WO 200222808 (Reivindicação 2; Figura 1); documento US 5854399 (Exemplo 2; coluna 17- 18); documento US 5792616 (Figura 2);

Referências Cruzadas: MIM: 187395; NP_003203.1; NM_003212_1

188 aa

MDCKRMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWFOEPAIR
 PRSSQVRVPPMGIQHSKELNRTCCIMGCTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCOSVPH
 DTWLPKXCSLCKCHGQLRCFPQAFLEQCDGLVMDENHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGI
 CLSIQSYF

{SEQ ID NO:13}

(14) CD21 (CR2 (recetor de complemento 2) ou C3DR (recetor de vírus C3d/Epstein Barr) ou Hs.73792, N° de acesso do Genbank M26004);

Fujisaku *et al.* (1989) J. Biol. chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J. *et al.* J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 9194-9198, 1987; Barel M, *et al.* Mol. Immunol. 35,1025-1031,1998; Weis J.J., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S. K, *et al.* (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; documento WO 2004045520 (Exemplo 4); documento US 2004005538 (Exemplo 1); documento WO 2003062401 (Reivindicação 9); documento WO 2004045520 (Exemplo 4); documento WO 9102536 (Figura 9.1-9.9); documento WO 2004020595 (Reivindicação 1); Acesso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

1033 aa

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPFPILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGE
 KSLLCITKDKVDGTWDKPAKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTFYRHGDSVTFACKT
 NPSMNGNKSVMCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVT
 YSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARCKSLGRFPNGKVKEPPILRVGV TANF
 FCDEGYRLQGPPSSRCVIAGQGVAWTKMPVCEEIFCPSPFPILNGRHHIGNSLANVSYGSI
 VTYTCDPDREEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCCELSTSAVQCPhiPQILGR
 MVSQOKDRYTYNDTVIFACMFGFTLKGSQKQIRCNAQGTWEPSAPVCEKECQAPPNINLGO
 KEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQTSEGVWTFPPVPOCKVAACEATGRQLLT
 KPQHQFVRFDVNSSCGEGYKLSGSVYQEQGTIPWFMEIRLCKEITCPPPVIYNGAHTG
 SSLEDFPYGTTVTYTCNPGPERGVFSLIGESTIRCTSDQERGWTWSGPAPLCKLSLLAV
 QCSHVHIANGYKISGKBAPYFYNDTVTFKCYSGFTLKGSQKQIRCADNTWDFPIPVCEKE
 TCQHVRSQSLQELPAGSRVELVNTSCQDGYQLTGHAYQMCQDAENGINFKKIFLCKVIHCH
 PFPVIYNGKHTGMMMAENFLYGNEVSYECDQGFYLLGEKKLQCRSDSRGHGSWSGSPSQCL
 RSPPVTRCPNPEVKGHYKLNKTHSAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNIWVPGV
 PTCIKKAFIGCFPPPKTFPNGNHTGNIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLCTHEGTW
 SQPAPHCKEVNCCSPADMDGIQKGLEPRKMYQYGA VVTLCECDGYMLEGSPQSQCQSDHQ
 WNEPFLAVCESRSLAPVLCGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDTSQKRAHLEA
 REVYSVDYPNPAS

(SEQ ID NO:14)

(15) CD79b (CD79B, CD79(3, Igb (beta imunoglobulina-
 associada), B29, N° de acesso do Genbank NM_000626) ou
 11038674, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100
 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et
 al. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); documento
 WO 2004016225 (Reivindicação 2, Figura 140); documento
 WO 2003087768, US 2004101874 (Reivindicação 1, página
 102); documento WO 2003062401 (reivindicação 9);
 documento WO 200278524 (Exemplo 2); documento US
 2002150573 (reivindicação 5, página 15); documento US
 5644033; documento WO 2003048202 (reivindicação 1,
 páginas 306 e 309); documento WO 99/558658, US 6534482
 (reivindicação 13, Figura 17A/B); documento WO 200055351
 (reivindicação 11, páginas 1145-1146);

Referências Cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1;
 NM_000626_1

229 aa

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRWQSPRFIARKRGFT
 VKMHCMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIGIRFEDNGIY
 FCQKQCNNTSEVYQGGTELRVMGFSTLAQLKQNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
 LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGENPQGE

{SEQ ID NO:15}

(16) FcRH2, (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (domínio SH2 contendo proteína âncora de fosfatase 1a), SPAP1B, SPAP1C, N° de acesso do Genbank NM_030764),
 Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; documento WO 2004016225 (Reivindicação 2); documento WO 2003077836; documento WO 200138490 (reivindicação 5; Figuras 18D-1-18D-2); documento WO 2003097803 (Reivindicação 12); documento WO 2003089624 (Reivindicação 25); Referências Cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM 030764 1
 508 aa

MLLWSLLVIFDAVTEQADSLTLVAPSSVFEGDSIVLKCQGEQNWKIQKMAYHKDNKELSV
 FKXFSDFLIQSASVLSDSGNVFCSTKGQLFLWDKTSNIVKIKVQELFQRFVLTASSFQPIE
 GGPVSLKCETRLSPQRLDVQLQFCFFRENQVLGSGWSSSPQLQISAVWSEDTGSYWCKAE
 TVTHRIRKQSLQSIHVQRIPISNVSLERAPGGQVTEGQKLILLCSVAGGTGNVTFPSWY
 REATGTSNGKKTQRSLSAELEIPAVKESDAGKYICRADNGHVPIQSKVVNIPVRIPVSRP
 VLTLSRFGAQAAGVDLLELHCEALRGSPPILYQFYHEDVTLGNSSAPSGGGASFNLSLTA
 EHSCHNYSCEANGLGAQCSEAVPVVISGPDGYRRDLMTAGVLWGLFGVLGFTGVALLLYA
 LFKHISGESSATNEPRGASRPNPQREFTYSSPTPDMEELQPVYVNVGSVDVDVYVSQVWSM
 QQPESSANIRTLLENKDSQVIYSSVKKS

{SEQ ID NO:16}

(17) HER2 (ErbB2, N° de acesso do Genbank M11730. Coussens L, et al. Science (1985) 230(4730): 1132-1139; Yamamoto T, et al. Nature 319, 230- 234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J. M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003;

Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; documento WO 2004048938 (Exemplo 2); documento WO 2004027049 (Figura 11); documento WO 2004009622; documento WO 2003081210; documento WO 2003089904 (Reivindicação 9); documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento US 2003118592; documento WO 2003008537 (Reivindicação 1); documento WO 2003055439 (Reivindicação 29; Fig 1A-B); documento WO 2003025228 (Reivindicação 37; Figura 5C); documento WO 200222636 (Exemplo 13; Página 95-107); documento WO 200212341 (Reivindicação 68; Figura 7); documento WO 200213847 (Páginas 71-74); documento WO 200214503 (Páginas 114- 117) WO 200153463 (Reivindicação 2; Páginas 41-46); documento WO 200141787 (Páginas 15); documento WO 200044899 (Reivindicação 52; Figura 7); documento WO 200020579 (Reivindicação 3; Figura 2); documento US 5869445 (Reivindicação 2; coluna 31-38); documento WO 9630514 (Reivindicação 2; Páginas 56-61); EP 1439393 (Reivindicação 7); documento WO 2004043361 (Reivindicação 7); documento WO 2004022709; documento WO 200100244 (Exemplo 3; Figura 4); Acesso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

1255 aa

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRFPASFETHLDMLHLYQGCQVVGQNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNOVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNG
 DFLNNTTFVTGASPGGLRELQLRSITBILKGGVLIQRNPQLCYQDTILNKDIFHKNNQLA
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLETDCCHEQC
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACF
 YNYLSTDVGSCTLVCPHLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSAN
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLERITGYLYISAWPDSL
 DLSVFNQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHTHLCFVHTV
 FWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLAHQLCARGHCWGEGPTQCVNCSQFLRGQEC
 VBECHVLQGLFREYVNAHCLPCHPECPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARC
 PSQVKPDLSPYPIWKPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKCPAQRASPLTSIISAVVG
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQKKIRKYTMRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL
 RKVKVLGSGAGFTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTSEPKANKELDEAYVMAGVGSF
 YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMFYGCCLDHVRENHRLGSGQDLINWCMQIAKMSYLEDR
 LVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPIKMMALLESILRRPT
 HQSDVNSYGVTVWELNTPGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
 IDSECHPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEEDLGPASPLDSTFYRSILLEDDMGDLVDA
 EBYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRSGGDLTLGLEPSEERAPRSPLAPSEG
 AGSDVFDGDLGNGAAKGLQSLPFDHPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV
 NQFDVRFQPPSPREGPLPAARFAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGAVENFEYLTPO
 GGAAPQPHPPAFSPAFDNLVYWDQDPPERGAPPSTFKGTFTAENFEYLGLDVFP

(SEQ ID NO:17)

(18) NCA (CEACAM6, N° de acesso do Genbank M18728);
 Barnett T., et al. Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y.,
 et al. Biochem Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988;
 Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
 99:16899-16903, 2002; documento WO 2004063709; EP
 1439393 (Reivindicação 7); documento WO 2004044178
 (Exemplo 4); documento WO 2004031238; documento WO
 2003042661 (Reivindicação 12); documento WO 200278524
 (Exemplo 2); documento WO 200286443 (Reivindicação 27,
 Página 427); documento WO 200260317 (Reivindicação 2);
 Acesso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1 EMBL;
 M18728; 344 aa

MGPFSAPPCRLHVPKKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFPNVAEGKEVLLLAHNLDPQ
 NRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTONDTGFI
 TLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSENSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWV
 NQOSLPVSPRLQLSNGNMTLTLSVVRNDAGSYECBIQNPAANRSDPVTILNVLYGPDVE
 TISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQTQELFIPNITVNNSGSYMCQ
 AHSATGLNRTTVMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

(SEQ ID NO:18)

(19) MDP (DPEP1, N° de acesso do Genbank BC017023),
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (26):16899-16903 (2002);
 documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento WO
 200264798 (Reivindicação 33; Páginas 85-87); JP 05003790
 (Figuras 6-8); documento WO 9946284 (Figura 9);
 Referências Cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC₀₁7023_1
 411 aa

MWSGWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSFVIDGHNDLPWQLDMFNNRLQDERANLTT
 LAGHTNIPKLRAQFVGGQFWSVYTPCDTONKDAVRRTLQMDVVHRMCRMYPETFLYVT
 SSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRLALYQLGMRYLTITHSCTFPWADNWL
 DTGDSEPOSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLLIDLAHVSVAATMKATLQLSRAPVIFSHSSAYS
 VCASRRNVDPDDLRLVKQIDSLVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVG
 FGGDFDGVPRVPEGLEEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFEAVEQASNL
 QAPBEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

(SEQ ID NO:19)

(20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, N° de acesso do Genbank
 AF184971); Clark H.F. *et al.* Genoma Res. 13, 2265-2270,
 2003; Mungall A.J., *et al.* Nature 425, 805-811, 2003;
 Blumberg H., *et al.* Cell 104, 9-19, 2001; DumoutierL, *et al.*
 J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J.,
et al. J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev
 S., *et al.* (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh
 F., *et al.* (2004) J. Immunol, 172, 2006-2010; EP 1394274
 (Exemplo 11); documento US 2004005320 (Exemplo 5);
 documento WO 2003029262 (Página 74-75); documento WO
 2003002717 (Reivindicação 2; Página 63); documento WO
 200222153 (Página 45-47); documento US 2002042366
 (Páginas 20-21); documento WO 200146261 (Páginas 57-59);

documento WO 200146232 (Páginas 63-65); documento WO 9837193 (Reivindicação 1; Páginas 55-59); Acesso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1. 553 aa

MRAPGRPALRPLPLPLPLLLLLLLAAPWGRAVPCVSGGLPKPANITFLSINMKNVLQWTPPE
GLQGVKCVTYTVQYFIYGQKKWLNKSECRNINRTYCDLSAETS DYEHQYYAKVKAIWGKTC
SKWASSGRFYFFLETQIGPPEVALTTDEKSI SVVLTAPKERNPEDLPVEMQQIYSNLK
YNVSVLNTKSNRTWSQCVTNHTLVLTWLEPNTLYCVHVESFVPGPPRAQPSEKQCARTL
KDQSSEPKAKIIFWYVLPISITVFLFSVMGYSIYRYIHVGKEKHPANLILYGNFEDKRF
FVFANKIVINFITLNISSDDSKISHQDMSLLGKSSDVSSLMDFQPSGNLRPPQEEBEVKHL
GYASHLMEIFCDSEKENTEGTSFTQQESLSRTIFPDKTIVIEYEDVRTTIDICAGPEEQELS
LQEEVSTQGTLLSQALAVLGPQTLOYSYTPQLQOLDPLAQEHTDSEEGPEKEPSTTLV
DWDPTGRLCIPSLSSFDQDSEGCPESEGDGLGEEGLLSRLYEPAPDRPPGENETYLMQ
FMEENGLYVQMEN

(SEQ ID NO:20)

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N° de acesso do Genbank AF229053); Gary S.C., et al. Gene 256, 139-147; 2000; Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16899- 16903, 2002; documento US 2003186372 (Reivindicação 11); documento US 2003186373 (Reivindicação 11); documento US 2003119131 (Reivindicação 1; Figura 52); documento US 2003119122 (Reivindicação 1; Figura 52); documento US 2003119126 (Reivindicação 1); documento US 2003119121 (Reivindicação 1; Figura 52); documento US 2003119129 (Reivindicação 1); documento US 2003119130 (Reivindicação 1); documento US 2003119128 (Reivindicação 1; Figura 52); documento US 2003119125 (Reivindicação 1); documento WO 2003016475 (Reivindicação 1); documento WO 200202634 (Reivindicação 1);

911 aa

MAQLFLPLLAALVLAQAPAAALADVLEGDSSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLOGALTIPCHVH
 YLRPPFSEAEAVLGSFVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYEFVRVALPAYPASLTDV
 SLALSELRPNDSCIYRCEVQHGIDDSSDAVEVKVKGVVFLYNEGSARYAFSFGAQEACA
 RIGAHATPEQLYAAVLGGYEQCDAGWLSQTVRYPIQTPREACYGDMGDFPGVENVYGVV
 DFDLLYDVYCYAEDLNGELFLGDPFEKLTLEEARAYCQERGAEIATTOQLYAANDGSLDH
 CSPGNLADGSRYPVITPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGFPNKHSPFNVYCFRDSAQPS
 AIFEASNPASNPASDGLAIVIVTETLEELQLPQKATESESRGAIYSIPIMEDGGGSSST
 PEDFAEAPRTILLEFETQSMVPFTGFSSEEGKALEEKEKYEDEEKEKEKEKEKEVEDEKALW
 ANPSELSSPGFASLPTEPAAQEKSLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPFVRNGPPT
 ETLFTPREENLASPSPSTLVAREVGEATGGFELSGVFRGESEETGSSEGAPELIPATRA
 FEQTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQFVLPTDSASRGGVAVVPASGDCVPSPCNNGOT
 CLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGACYKHPSTRSWESEARTQCRMYS
 AHLASISTPREEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPQQPDSYFLS
 GENCVMVWHDQQQWSDVPCNYHLSYTCMGLVSCGPPPELFLAQVFGFRPELEYEVDTVL
 RYECREGLAQRNLFLIRCQENGREAPQISCVPRRPARALHFEEDFEGEQGILLGRNEAL

{SEQ ID NO:21}

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N° de acesso do Genbank NM_004442) Chan, J. e Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991), Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Inte. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); documento WO 2003042661 (Reivindicação 12); documento WO 200053216 (reivindicação 1; Página 41); documento WO 2004065576 (Reivindicação 1); documento WO 2004020583 (Reivindicação 9); documento WO 2003004529 (Páginas 128-132); documento WO 200053216 (Reivindicação 1; Página 42);

Referências Cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

987 aa

MALRRLLGAALLLLPLLAVERETLMDSTTATAELGNMVPFSGWEEVSGYDENMNTIRTYQ
 VCNVFESSQNNWLRTKFIERRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPSVPGSCKETFNLYYYEADF
 DSATKTFPNWMENPWVKVDTIAADESFSQVDLGGVMEINTEVRSPGPVSRSGFYLAFOQ
 YGGCMSLIAVRVFRKPCRIIQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGSCIANAEVDPVPIKLY
 CNGDGEWLVPFIGRCNCKAGFEAVENGTVCRGCPSGTFKANQGDDEACTHCPINSRTTSEGA
 TNCVCRNGYIRADLEPLDMPCTTIPSAPQAVISSVNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNI
 ICKSCGSGRGACTRCGDWVQYAPRQLGLTEPRIYISDLLARTQYTFEIQAVNGVTDQSPF
 SPQFASVNITTNQAAPSAVSIMHQVSRTVDSITLSNSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSE
 YNATAIKSPNTNTVTQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSCKMYFQTMTRAEYQTSIQEK
 LPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRRGFERADSEYTDKQLQHYTSGHMTPGMKIYIDP
 FTYEDPNRAVREPAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSCHLKLPGKREIFVAIKTLKSGY
 TEKQRDFLSEASIMGQFDHPNVHLEGVVTKSTPVMITEPMENGSLDSFLRQNDGQFT
 VIQLVGNLREGIAAGNKYLADMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPT
 YTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGVIMWEVMSYGERPYWDMTEQDVINAI
 EQDYRLPPPMDCPBALHQLMLDCWQKDNHRPKFGQIVNTLDKMIIRNPSELKAMAPLSSG
 INLPLLDRTIPTDYTSFNTVDENLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMEDILRVGVT
 LAGEQKKILNSIQVMRAQMNQIQSVEV

(SEQ ID NO:22)

(23) ASLG659 (B7h, N° de acesso do Genbank AX092328);
 US 2004010899 (Reivindicação 2); documento WO 2003104399
 (Reivindicação 11); documento WO 2004000221 (Figura 3);
 documento US 2003165504 (Reivindicação 1); documento US
 2003124140 (Exemplo 2); documento US 2003065143 (Figura
 60); documento WO 2002102235 (Reivindicação 13, Página
 299); documento US 2003091580 (Exemplo 2); documento WO
 200210187 (Reivindicação 6, Figura 10); documento WO
 200194641 (Reivindicação 12, Figura 7b); documento WO
 200202624 (Reivindicação 13, Figura 1A-1B); documento US
 2002034749 (Reivindicação 54; Páginas 45-46); documento
 WO 200206317 (Exemplo 2; Páginas 320-321, Reivindicação
 34; Páginas 321-322); documento WO 200271928 (Páginas
 468-469); documento WO 200202587 (Exemplo 1, Figura 1);
 documento WO 200140269 (Exemplo 3, Páginas 190-192);
 documento WO 200036107 (Exemplo 2, páginas 205-207);
 documento WO 2004053079 (Reivindicação 12); documento WO
 2003004989 (Reivindicação 1); documento WO 200271928
 (Páginas 233-234, 452-453); documento WO 0116318;

282 aa

MASLGQILFWSIISIIIIILAGAIATIIGFGISGRHSITVTTVASAGNICSDGILECTFEP
 DIKLSDIVIQWLKEGVGLVHEFKKGDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKNV
 QLTDAGTYKCYIITSKGGKMANLEYKIGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRNFPQPTVV
 WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
 TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLFLSPYMLK

(SEQ ID NO:23)

(24) PSCA (Precursor de antigénio de célula estaminal prostática, N° de acesso do Genbank AJ297436); Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; documento WO 2004022709; EP 1394274 (Exemplo 11); documento US 2004018553 (Reivindicação 17); documento WO 2003008537 (Reivindicação 1); documento WO 200281646 (Reivindicação 1; Página 164); documento WO 2003003906 (Reivindicação 10; Página 288); documento WO 200140309 (Exemplo 1; Figura 17); documento US 2001055751 (Exemplo 1; Figura 1b); documento WO 200032752 (Reivindicação 18; Figura 1); documento WO 9851805 (Reivindicação 17, Página 97); documento WO 9851824 (Reivindicação 10; Página 94); documento WO 9840403 (Reivindicação 2; Figura 1B);

Acesso: 043653; EMBL; AF043498; AAC₃₉607.1.

123 aa

MAVLLALLMAGIALQPGTALLCYSCKAQVSNEDECLQVENCTQLGECWTARIRAVGLLT
 VISEGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDTLNCASGAHALQPAAILALLPALGLLLWGP
 GQL

(SEQ ID NO:24)

(25) GEDA (N° de acesso do Genbank AY260763); proteína do tipo-parceiro de fusão HMGIC lipoma AAP14954 /pid=AAP14954.1 - *Homo sapiens*
 Espécie: *Homo sapiens* (ser humano)
 Documento WO 2003054152 (Reivindicação 20); documento WO 2003000842 (reivindicação 1); documento WO 2003023013 (Exemplo 3, Reivindicação 20); documento US 2003194704

(Reivindicação 45);

Referências Cruzadas: G1:30102449; AAP14954.1;
AY260763_1

236 aa

**MPGAAAAAAAAAAMLPAGEAAKLYHTNYVRNSRAIGVLWAIFTICFAIVNVVCFIQPYW
IGDGVDTTPQAGYFGLFHYCIGNGFSRELTGRGSFTDFSTLPSGAFKAASFFIGLSMMLII
ACIICFTLFFFCNTATVYKICAWMQITSAACLVLGCMIFPDGWDSEVERMCGEKIDKYT
LGACSVRWAYILAIIGILDALILSFLAFVLGNRQDSLMAEELKAENKVLLSQYSLE**

(SEQ ID NO:25)

(26) BAFF-R (recetor de fator de ativação de célula B, recetor BLYS 3, BR3, N° de acesso do Genbank NP_443177.1); NP_443177 recetor BAFF/pid=NP_443177.1 - *Homo sapiens* Thompson, J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO 2004058309; documento WO 2004011611; documento WO 2003045422 (Exemplo; Páginas 32-33); documento WO 2003014294 (Reivindicação 25; Figura 6B); documento WO 2003035846 (Reivindicação 70; Páginas 615-616); documento WO 200294852 (Coluna 136-137); documento WO 200238766 (Reivindicação 3, Página 133); documento WO 200224909 (Exemplo 3, Figura 3); Referências Cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1

184 aa

**MRRGPRSLRGSDAPAFTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPETALQPO
ESVGAGAGEAALFLPGLLFGAPALLGLALVIALVLVLVGLVSWRRRQRRRLRGASSAEAPDGD
KDAPEPLDKVILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVFPATELGSTELVTTKTAG
PEQQ**

(SEQ ID NO:26)

(27) CD22 (isoforma de recetor de célula B CD22-B, N° de acesso do Genbank NP_001762.1); Stamenkovic, I., e Seed, B., Nature 345 (6270), 74-77 (1990); documento US 2003157113; documento US 2003118592; documento WO 2003062401 (Reivindicação 9); documento WO 2003072036 (Reivindicação 1, Figura 1); documento WO 200278524 (Exemplo 2); Referências Cruzadas: MIM:107266;

NP_001762.1; NM_001771_1

847 aa

MHLGFWLLLLLVLSYLAFSDDSSKQVFEHPETLYAWEGACVWIFCTYRALDGDLESFILFH
 NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDQKVPSEQKRVQFLGDKNKNTLSIHVPVHLNDSGQLGLR
 MESKTEKWMERIHNVSEPPPPHIQLPPETIQESQEVTLTCLLNPFSCYGYPTQLQWLLEG
 VPMRQAAVTSTSLTIKSVPTSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQINVKH
 TPKLEIKVTFPSDAIVREGDSVTMTCEVSSNPETTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLRVT
 KDQSGKYCCQVSNVGPGRSEEVFLQVQYAPFPSTVQILHSPAVEGSGQVEFLCMSLANPL
 PTNYTWYHNGKEMQGRTERKVHPIKILPWHAGTYSVAENILGTGQRGPGAEILDVQYPPK

KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCTNYSNPNPVSTRYEWKPHGAWEEPGLGVLKIQNVGWDNT
 TIACARCNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKFLSEIHSGNSVSLQDFSSSHPKQVQ
 FFWKNGRLLGKESQLNFDNISPEDAGSYSCWNNISIGQTASKANTLEVLYAPRRLRVSM
 SPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDNWNQSLPHHSQKLRLFPVKVQHSQAYWQ
 GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAAILILAICGLKLRKRWKRTQSQG
 LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPMSLGCYNPMEDGISYTTLRFPENIPIRTGDAES
 SEMQRPRTCDTDTVTYSALNKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV
 DYVILKH

(SEQ ID NO:27)

(28) CD79a (CD79A, CD79a, alfa imunoglobulina-associada, uma proteína específica de célula B que interage covalentemente com lg beta (CD79B) e forma um complexo na superfície com moléculas lg M, faz a transdução de um sinal envolvido na diferenciação de célula B) SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA completa mpggpgv...dvqlekp (1..226; 226 aa), pI:4.84, PM:25028 TM:2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2, N° de acesso do Genbank NP_001774.1;

Documento WO 2003088808, US 20030228319; documento WO 2003062401 (reivindicação 9); documento US 2002150573 (reivindicação 4, páginas 13-14); documento WO 9958658 (reivindicação 13, figura 16); documento WO 9207574 (Figura 1); documento US 5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

226 aa

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCCALMMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSN
 NANVTWVRVLNGNYTWPPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGSIYVCRVQEGNESYQOSCG
 TYLRVRQPPFPFLDMGEGTKNRIITASGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGD
 EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTQDVGSLNIGDVQLEKP

(SEQ ID NO:28)

(29) CXCR5 (recetor 1 de linfoma de Burkitt, um recetor acoplado a proteína G que é ativado pela quimiocina CXCL13, funciona na migração de linfócito e defesa humoral, possui um papel na infecção por VIH-2 e talvez no desenvolvimento de SIDA, linfoma, mieloma, e leucemia) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa mnypltl ... atslttf (1..372; 372 aa), pl:8,54 MW:41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3, N° de acesso do Genbank NP_001707.1);

Documento WO 2004040000; documento WO 2004015426; documento US 2003105292 (Exemplo 2); documento US 6555339 (Exemplo 2); documento WO 200261087 (Figura 1); documento WO 200157188 (Reivindicação 20, página 269); documento WO 200172830 (páginas 12-13); documento WO 200022129 (Exemplo 1, páginas 152-153, Exemplo 2, páginas 254-256); documento WO 9928468 (reivindicação 1, página 38); documento US 5440021 (Exemplo 2, col 49-52); documento WO 9428931 (páginas 56-58); documento WO 9217497 (reivindicação 7, Figura 5); Dobner *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella *et al.* (1995) *Biochem. J.* 309:773-779);

372 aa

MNYPLTLEMDLENLEDLPWELDRLDNYNDTSLVENHLCEPTEGPLMASFKAVFVPVAYSL
 IFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHLAVADLLLVLFPFAVAEGSVGVVLGTF
 LCKTVIALHKVNFYCSSLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHITCGTIWLVGFL
 ALFEILFAKVSQGHNNNSLPRCTFSQENQAETHANFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCYVG
 VVHRLRQAQRQPQRQKAVEVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNGSL
 PVAITMCEFLGLAHCCLNPMLYTFAGVKFRSDLSRLLTCLGCTGPASLCQLFPSWRRSSL
 SRSNNATSLTTF

(SEQ ID NO:29)

(30) HLA-DOB (subunidade beta de molécula MHC classe II (antigénio Ia) que se liga a péptidos e os apresenta aos linfócitos CD4+ T) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa msgsgwvp ...vllpqsc (1..273; 273 aa, pl: 6.56 PM:30820 TM: 1 [P] Gene Chromosome:6p21.3, número de acesso do Genbank NP_002111.1);

Tonnelle *et al.* (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson *et al.* (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 228:433- 441; Strausberg *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:16899-16903; Serenius *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse *et al.* (2002) Tissue Antigens 59:512-519; documento WO 9958658 (reivindicação 13, Figura 15); documento US 6153408 (Col 35-38); documento US 5976551 (coluna 168-170); documento US 6011146 (coluna 145-146); Kasahara *et al.* (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar *et al.* (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

273 aa

MSGGWVPWVVALLVNLTRLDSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVFVVRPIFNL
EYVRFDEEDVGMFVALTKLGQFDAQWNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRX
VQFEVTVYPERTPLLHQNLLHCSVTGPFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPIRNGDWT
FQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSLLSPVSEVWEAQQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIFLL
VGIVIQLRQAQKGYVETQMSGNEVSRVLLPQSC

(SEQ ID NO:30)

(31) P2X5 (canal 5 de ião de ligando fechado P2X de recetor purinérgico, um canal de ião fechado por ATP extracelular, pode estar envolvido na transmissão sináptica e neurogénese, deficiência pode contribuir para a fisiopatologia de instabilidade de detrusor idiopático) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa mgqagck.Jephurst (1..422; 422 aa), pl:7,63, PM:47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome:17p13.3, N° de acesso do Genbank NP_002552.2;

Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2): 195-199; documento WO 2004047749; documento WO 2003072035 (reivindicação 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; documento WO 200222660 (Reivindicação 20); documento WO 2003093444 (Reivindicação 1); documento WO 2003087768 (Reivindicação 1); documento WO 2003029277 (página 82); 422 aa

MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAQNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWVFLIKKGYQDVDT
SLQSAVITKVKGVAFTNTSDLGQRINDVADYVIPAQGENVFFVVTNLIVTPNQEQNVCAE
NEGIPDGCASKSDSDCHAGEAVTAGNGVKTGRCLRRNLARGTCEIFAWCPLETSSRFEEP
FLKKAEDFTIFIKNHIRFPKFNFSKSNVMDVKDRSFLKSCHFGPKNHYPPIFRLGSVIRW
AGSDFQDIALEGVIGINIEWNCDLKAASECHPHYSFSLDNKLSKSVSSQYNFRFARY
YRDAAGVEFRTLKAYGIRFDVMVNGKGAFFCDLVLIYLIKREFYRDKKYEEVRGLEDS
SQEADEASGLGLSEQLTSGPGLLGMPBQCELQEPPEAKRGSSSQKNGSGVCPQLLEPHR
ST

(SEQ ID NO:31)

(32) CD72 (antigénio de diferenciação de célula B CD72, Lyb-2) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8,66, PM: 40225 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3, N° de acesso do Genbank NP_001773.1; Documento WO 2004042346 (reivindicação 65); documento WO 2003026493 (páginas 51-52, 57-58); documento WO 200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg (2002) Proc. Natl. Acad. Sei USA 99:16899-16903; 359 aa

MAEAITYADLRFVKAPLKKSISSELGQDPGADDDGEITYENVQVPAVLGVPSLASSVLG
DKAAVKSEQPTASWRAVTSPAVGRILPCRTTCLRYLLGLLLTCLLLGVTAICLGVRYLQ
VSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQSSRRELAQSQALQVEQRAHQ
ABQQLQACQADRQTKETLQSEEQRRALBQKLSNMENLKPFFTCGSADTCCPSGWIMH
QKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFFLNSLLPNGSGNSYWTG
LSSNRDWNLTDDTQRTRTYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPYICEMTAFRFPD

(SEQ ID NO:32)

(33) LY64 (antigénio de linfócito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I da família de repetição rica de leucina (LRR), regula a ativação de célula B e apoptose, perda de função está associada com atividade aumentada

de doença em pacientes com eritematose de lúpus sistêmico) SEQUÊNCIA de PROTEÍNA completa mafdvsc...rwkyqhi (1 ..661; 661 aa) pl:6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Gene Chromosome:5q12, N° de acesso do Genbank NP_005573.1; documento US 2002193567; documento WO 9707198 (reivindicação 11, páginas 39-42); Miura *et al.* (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura *et al.* (1998) Blood 92:2815- 2822; documento WO 2003083047; documento WO 9744452 (Reivindicação 8, páginas 57-61); documento WO 200012130 (páginas 24-26);

661 aa

MAFDVSCFFWVVLPSAGCKVITSWDQMCIEKEANKTYNCENLGLSEIPDTLPNTTEFLEF
SFNPLPTIHNRTFSRLMMLTFDLTRCQINWIHEDTFQSHHQLSTLVITGNPLIFMAETS
LNGPKSLKHLFLIQTGISNLEFIPVHNLENLESLYLGSNNHISSIKFPKDFPARNLKVLDF
QNNAIHYISREDMRSLEQAINLSLNFNCGNNVKGIELGAFDSTVFQSLNFGGTPNLSVIFN
GLQNSTTQSLNLGTFEDIDDEDISSAMLKGLCEMSVESLNLQEHFSDISSSTTFQCFTQL
QELDLTATHLKGLPSGMKGLNLLKKLVLSVNHFDQLCQISAANFPSTHLYIRGNVKKLH
LGVCLEKLGNLQTLDLSHNDIEASDCCSLQKLNLSHLQTLNLSHNEPLGLSQAFKECP
QLELLDLAFTRLHINAPQSFFQNLHFLQVLNLTYCFLDTSNQHLLAGLPVLRHLNLKGNH
FQDGTITKTNLILQTVGSLEVLILSSCGLLSIDQQAFFHSLGKMSHVDLSHNSLTCDSDSL
SHLNGIYLNLAANSINIISPRLLPILSQQSTINLSHNPLDCTCSNIHFLTWYKENLHKLE
GSEETTCANPPSLAGVKLSDVKLSGGITAIGIFFLIVFLLLLAILLPFAVKYLLRWKYQH
I

(SEQ ID NO:33)

(34) FCRH1 (proteína 1 tipo recetor Fc, um recetor putativo para o domínio de imunoglobulina Fc que contém domínios C₂ tipo semelhante a Ig e ITAM, pode ter um papel na diferenciação de linfócito B) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa mlprlIL.vdyedam (1..429; 429 aa); pl:5,28, PM:46925 TM:1 [P] Gene Chromosome: 1q21-1q22, N° de acesso do Genbank NP_443170.1; Documento WO 2003077836; documento WO 200138490 (reivindicação 6, Figuras 18E- 1-18-E-2); Davis *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(17):9772-9777; documento WO 2003089624 (reivindicação 8); EP 1347046 (reivindicação 1); documento WO 2003089624 (reivindicação 7);

429 aa

MLPRLLLLLCAPLCEPAELFLIASPSHPTEGSFVTLTCKMPFLQSSDAQFQFCFFRDTRA
 LGPGWSSSPKLQIAAMWKEDTGSYWCEAQTMAKVLRSRRSQINVHRVPVADVSLQTQPP
 GGQVMEGDRLLVLCISVANGTGDITFLWYKGAUGLNLQSKTQRSITAEYEIPSVRESDAEQ

YYCVAENGYGPSPSGLVSITVRIPVSRPILMLRAPRAQAAVEDVLELHCEALRGSPPILY
 WFYHEDITLGSRSAPSGGGASFNLSLTERHSGNYSCEANGLGAQRSEAVTLNFTVPTGA
 RSNHLTSGVIEGLLSTLGPATVALLFCYGLKRRIGRRSARDPLRSLPSPLPQEFTYLNSP
 TPGQLQPIYENVVNVSGDEVYSLAYYNQFEQESVAAETLGTHTMEDKVSLEIYSRLRKANI
 TDVDYEDAM

(SEQ ID NO:34)

(35) IRTA2 (translocação de recetor da superfamília imunoglobulina associada 2, um imunorrecetor putativo com possíveis papéis no desenvolvimento da célula B e linfomagéne; desregulação do gene pela translocação ocorre em algumas malignidades de célula B) SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA completa mllwviL.assaphr (1.977; 977 aa), pl:6.88 PM:106468 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1 q21, N° de acesso do Genbank NP_112571.1; documento WO 2003024392 (reivindicação 2, Figura 97); Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; documento WO 2003077836; documento WO 200138490 (reivindicação 3, Figuras 18B-1-18B-2); 977 aa

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLOPPWTTVFOGERVTLTCKGPRFYSPQKTKWYHR
 YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLOFSSASLILQAPLSVFEEDSVV
 LRCRAKAEVTLKNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIFHACLKDNNGAYRGTGYKESCCPVSSNT
 VKIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCTQQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWS
 LSENFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVIEDSPRSNIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFE
 GTKVTLHCETQEDSLRTLRYFYHEGVPLHKSVCRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNG
 LGAKPSKAVSLSVTPVSHPVNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAA
 LERRSANSAGGVAISFSLTAHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSTVPVSHPVLTLSA
 EALTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSLTEGHSNYY
 CTADNGFGPQRSEVVSFVTPVSRPILTLRVFRAQAVVGDILLELHCEAPRGSPPILYWF
 YHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSTAEHSGNYSCEANGLVAQHSOTISLSVIVPVSRI
 LTFRAPRAQAVVGDILLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGASFNLSLTER
 HSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSFVTLRAPGTHAAVGDILLELHCEALRGSP
 LILYRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNLSTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYITGL
 TANRSGPFATGVAGLLSIAGLAAGALLLYCWLSEKAGRKPASDPARSPPDSQSEPTYH
 NVFANEELQPVYTANPRGENVVYSEVRIIQEKKEHAVASDPHRLRNKGSPIIYSEVKVA
 STPVSGSLFLASSAPHR

(SEQ ID NO:35)

Veja-se também: documento W004/045516 (03 de Junho de 2004); documento W003/000113 (03 de Janeiro de 2003); documento W002/016429 (28 de Fevereiro de 2002); documento W002/16581 (28 de Fevereiro de 2002); documento W003/024392 (27 de Março de 2003); documento W004/016225 (26 de Fevereiro de 2004); documento W001/40309 (07 de Junho de 2001); e Pedido de Patente Provisória US N° de Série 60/520842 "COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN" depositada em 17 de Novembro de 2003.

Num exemplo, o Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando possui a Fórmula **IIIa**, onde o Ligando é um anticorpo Ab incluindo um que se liga a pelo menos um antígeno dentre CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 0, y = 0, e D possui a Fórmula Ib. Conjugados Exemplares de Fórmula **IIIa** incluem onde R¹⁷ for -(CH₂)₅-. Estão também incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** nos quais D possui a estrutura do Composto 2 no Exemplo 3 e ésteres do mesmo. Também estão incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** contendo cerca de 3 a cerca de 8, num aspeto, cerca de 3 a cerca de 5

frações de fármaco D, isto é, Conjugados de Fórmula Ia onde p é um valor no intervalo de cerca de 3- 8, por exemplo, cerca de 3-5. Conjugados contendo combinações das características estruturais observadas neste parágrafo são também descritos.

Noutro exemplo, o Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando possui a Fórmula **IIIa**, onde Ligando é um Anticorpo Ab que se liga a um dentre os antigénios CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 1, y = 0, e D tem a Fórmula Ib. Estão incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** nos quais R¹⁷ é -(CH₂)₅-. Estão também incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** nos quais W é -Val- Cit-, e/ou onde D tem a estrutura do Composto 2 no Exemplo 3 e ésteres do mesmo. Estão também incluídos os Conjugados de Fórmula **IIIa** contendo cerca de 3 a cerca de 8, preferivelmente cerca de 3 a cerca de 5 frações de fármaco D, isto é, Conjugados de Fórmula Ia onde p é um valor no intervalo de cerca de 3-8, preferivelmente cerca de 3-5. Conjugados contendo combinações das características estruturais mencionadas neste parágrafo são também exemplares.

Num exemplo, o Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando possui a Fórmula **IIIa**, onde o Ligando é um Anticorpo Ab que se liga a um dos antigénios CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 1, y = 1, e D tem a Fórmula Ib. Estão incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** nos quais R¹⁷ for -(CH₂)₅-. Estão também incluídos estes Conjugados de Fórmula **IIIa** onde: W é -Val-Cit-, Y tem a Fórmula X; D tem a estrutura do Composto 2 no Exemplo 3 e ésteres do mesmo; p é cerca de 3 a cerca de 8, preferivelmente cerca de 3 a cerca de 5 frações de fármaco D. Conjugados contendo combinações de características estruturais mencionadas nestes parágrafos são também contemplados.

Um exemplo adicional é um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC), ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, onde Ab é um anticorpo que se liga a um

dos antígenos associados a tumor (1) - (35) mencionados acima (o "Composto TAA").

Um outro exemplo é o Composto TAA ou sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo que está na forma isolada e purificada.

Também é descrito um método para destruir ou inibir a multiplicação de uma célula tumoral ou célula cancerígena que compreende a administração a um paciente, por exemplo, um ser humano com um distúrbio hiperproliferativo, de uma quantidade do Composto TAA ou um sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, a referida quantidade sendo eficaz para destruir ou inibir a multiplicação de uma célula tumoral ou célula cancerígena.

Também é descrito um método para o tratamento de cancro que compreende a administração a um paciente, por exemplo, um ser humano com um distúrbio hiperproliferativo, de uma quantidade do Composto TAA ou um sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, a referida quantidade sendo eficaz para tratar cancro, sozinha ou juntamente com uma quantidade eficaz de um agente anti-cancro adicional.

Também é descrito um método para tratar uma doença autoimune que compreende a administração a um paciente, por exemplo, um ser humano com um distúrbio hiperproliferativo, de uma quantidade do Composto TAA ou um sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, a referida quantidade sendo eficaz para tratar uma doença autoimune.

Os anticorpos adequados para utilização na invenção podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em especial, por síntese química ou por expressão recombinante, e são preferivelmente produzidos por técnicas de expressão recombinante.

4.5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Anticorpos podem ser produzidos usando qualquer método conhecido na técnica que seja útil para a síntese de

anticorpos, em especial, por síntese química ou por expressão recombinante.

A expressão recombinante de anticorpos, ou fragmento, derivado ou análogo dos mesmos, requer a construção de um ácido nucleico que codifique o anticorpo. Se a sequência de nucleótido do anticorpo for conhecida, um ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleótidos sintetizados quimicamente (por exemplo, conforme descrito por Kutmeier *et al.*, 1994, *BioTechniques* 17:242), que envolve a síntese de oligonucleótidos sobrepostos contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, associação e ligação daqueles oligonucleótidos, e então amplificação dos oligonucleótidos ligados, por exemplo, por PCR.

Alternativamente, uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo pode ser gerada de uma fonte adequada. Se um clone contendo o ácido nucleico que codifica o anticorpo específico não estiver disponível, mas a sequência do anticorpo é conhecida, um ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser obtido de uma fonte adequada (por exemplo, uma biblioteca de ADNc do anticorpo, ou biblioteca de ADNc gerada de qualquer tecido ou células que expressam a imunoglobulina), por exemplo, por meio de amplificação de PCR usando iniciadores sintéticos hibridizáveis para as extremidades 3' e 5' da sequência ou por meio de clonagem usando uma sonda de oligonucleótido específica a sequência de gene específica.

Se um anticorpo que especificamente reconheça um antígeno particular não estiver comercialmente disponível (ou uma fonte para uma biblioteca de ADNc para clonagem de um ácido nucleico que codifica esta imunoglobulina), anticorpos específicos para um antígeno específico podem ser gerados por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por imunização de um paciente, ou modelo animal adequado tal como um coelho ou ratinho, para gerar

anticorpos policlonais ou, mais preferivelmente, pela geração de anticorpos monoclonais, por exemplo, conforme descrito por Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) ou, conforme descrito por Kozbor *et al.* 1983, *Immunology Today* 4:72) ou por Cole *et al.* (1985 no *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Alternativamente, um clone que codifica pelo menos a fração Fab do anticorpo pode ser obtido por rastreamento de bibliotecas de expressão de Fab (por exemplo, conforme descrito por Huse *et al.*, 1989, *Science* 246:1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se ligam ao antígeno específico ou por rastreamento de bibliotecas de anticorpos (Veja-se, por exemplo, Clackson *et al.*, 1991 *Nature* 352:624; Hane *et al.* 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937).

Após uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos o domínio variável do anticorpo ser obtida, ela pode ser introduzida num vetor contendo a sequência de nucleótido que codifica as regiões constantes do anticorpo (veja-se, por exemplo, a Publicação Internacional Nº WO 86/05807; documento WO 89/01036; e Patente US Nº 5122464). Estão disponíveis vetores contendo a cadeia leve ou pesada completa, que permite a expressão de uma molécula de anticorpo completa. Então, o ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser usado para introduzir as substituições de nucleótido ou deleção necessária para substituir (ou deletar) um ou mais resíduos de cisteína da região variável que participam de uma ligação de bissulfeto intracadeia com um resíduo de aminoácido que não contém um grupo sulfidilo. Estas modificações podem ser executadas por qualquer método conhecido na técnica para a introdução de mutações ou deleções específicas numa sequência de nucleótido, por exemplo, mas não limitadas a mutagenese química e mutagenese direcionada por local *in vitro* (Hutchinson *et al.*, 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551).

Além disso, podem ser usadas técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314:452-454) por junção de genes de uma molécula de anticorpo de ratinho de uma especificidade de antígeno apropriada, juntamente com genes de uma molécula de anticorpo humano de atividade biológica apropriada. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual porções diferentes são derivadas de espécies animais diferentes, tais como aquelas que tem uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal de murino e uma região constante de imunoglobulina humana, por exemplo, anticorpos humanizados.

Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente US 4.694.778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; e Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-54) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única. Anticorpos de cadeia única são formados pela ligação dos fragmentos de cadeia pesada e leve da região Fv através de uma ponte de aminoácido, resultando num polipéptido de cadeia única. Técnicas para a montagem de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* podem também ser usadas (Skerra *et al.*, 1988, *Science* 242:1038-1041).

Fragmentos de anticorpo que reconhecem epítopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, estes fragmentos incluem, mas não se limitam aos fragmentos $F(ab')_2$ que podem ser produzidos por digestão de pepsina da molécula do anticorpo e os fragmentos Fab que podem ser gerados pela redução das pontes de bissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$.

Após uma sequência de ácido nucleico que codifica um anticorpo ter sido obtida, o vetor para a produção do anticorpo pode ser produzido por tecnologia de ADN recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica.

Métodos que são bem conhecidos por aqueles especializados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão que contenham as sequências que codificam o anticorpo e sinais de controlos de transcrição e tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, e recombinação genética *in vivo*. Veja-se, por exemplo, as técnicas descritas por Sambrook *et al.* (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) e Ausubel *et al.* (eds, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Um vetor de expressão que compreende a sequência de nucleótido de um anticorpo, ou a sequência de nucleótido de um anticorpo pode ser transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais (por exemplo, eletroporação, transfecção lipossômica, e precipitação de fosfato de cálcio), e as células transfectadas são, então, cultivadas por técnicas convencionais para produzir o anticorpo. Em formas de realização específicas, a expressão do anticorpo é regulada por um promotor específico constitutivo, indutível ou um tecido.

As células hospedeiras usadas para expressar o anticorpo recombinante podem ser tanto células bacterianas como *Escherichia coli*, como, preferivelmente, células eucarióticas, especialmente para a expressão de molécula de imunoglobulina recombinante integral. Em especial, células de mamíferos tais como células do ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vetor tal como o elemento promotor principal intermediário de gene inicial de citomegalovírus humano é um sistema de expressão efetivo para imunoglobulinas (Foecking *et al.*, 198, Gene 45:101; Cockett *et al.*, 1990, BioTechnology 8:2).

Uma variedade de sistemas de vetor de expressão de hospedeiro pode ser utilizada para expressar os anticorpos

de imunoglobulina. Estes sistemas de expressão de hospedeiro representam veículos através dos quais as sequências de codificação do anticorpo podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação de nucleótido apropriadas, podem expressar uma molécula de imunoglobulina de anticorpo *in situ*. Estes incluem, mas não se limitam a microrganismos tais como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com vetores de expressão de ADN de bacteriófagos recombinantes, ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídio contendo sequências de codificação de imunoglobulina; levedura (por exemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformado com vetores de expressão de levedura recombinantes contendo sequências de codificação de imunoglobulina; sistemas de célula de inseto infetados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo as sequências de codificação de imunoglobulina; sistemas de células vegetais infetados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus mosaico de couve-flor (CaMV) e vírus mosaico de tabaco (TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo as sequências de codificação de imunoglobulina; ou sistemas de células de mamíferos (por exemplo, células COS, CHO, BH, 293, 293T, 3T3) que ancoram construções de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; o promotor de vírus vacínia 7,5K).

Em sistemas bacterianos, uma série de vetores de expressão pode ser vantajosamente selecionada dependendo da utilização destinado para o anticorpo que está a ser expresso. Por exemplo, quando uma grande quantidade desta

proteína deve ser produzida, vetores que direcionam a expressão de altos níveis de produtos de proteína de fusão que são prontamente purificados devem ser desejáveis. Estes vetores incluem, mas não se limitam ao vetor de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J. 2:1791), nos quais a sequência de codificação do anticorpo pode ser ligada individualmente no vetor na estrutura com a região de codificação de lac Z, de modo que uma proteína de fusão seja produzida; vetores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); e semelhantes. Vetores pGEX podem também ser usados para expressar polipéptidos estrangeiros como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). No geral, estas proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas de células lisadas pela absorção e ligação a uma matriz de contas de glutathione-agarose seguidas por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores pGEX são designados para incluir locais de clivagem de protease de trombina ou fator Xa, de modo que o produto de gene alvo clonado pode ser libertado da fração GST.

Num sistema de inseto, vírus poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) ou o vírus análogo de *Drosophila melanogaster* é usado como um vetor para expressar genes estrangeiros. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência de codificação de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais do vírus (por exemplo, o gene poliedrina), e colocada sob controle de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor poliedrina).

Em células de hospedeiros de mamífero, uma série de sistemas de expressão baseados em vírus pode ser utilizada. Em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, a sequência de codificação do anticorpo de interesse pode ser ligada a um complexo de controle de

transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o promotor tardio e sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode, então, ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma virótico (por exemplo, região E1 ou E3) resulta num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de imunoglobulina em hospedeiros infestados, (por exemplo, veja-se Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Sinais de iniciação específicos podem também ser requeridos para tradução eficiente de sequências de codificação de anticorpo. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além do mais, o codão de iniciação deve estar em fase com a estrutura de leitura da sequência de codificação desejada para garantir a tradução da inserção inteira. Estes sinais de controlo de tradução exógenos e codões de iniciação podem ser de uma variedade de origens, tanto naturais quanto sintéticas. A eficiência de expressão pode se aumentada pela inclusão de elementos intensificadores de transcrição apropriados, terminadores de transcrição, etc. (veja-se Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Além disso, uma estirpe de célula hospedeira pode ser escolhida para modular a expressão das sequências inseridas, ou modificar e processar o produto de gene da maneira específica desejada. Estas modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) dos produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes possuem mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradução e modificação de proteínas e produtos de gene. Linhas celulares apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para garantir a modificação correta e processamento da proteína estrangeira expressa. Com este fim, células hospedeiras eucarióticas

que possuem a maquinaria celular para processamento apropriado da transcrição, glicosilação, e fosforilação primárias do produto de gene podem ser usadas. Estas células hospedeiras de mamífero incluem, mas não se limitam a, CHO, VERY, BH, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, CRL7030 e Hs578Bst.

Para produção de longa duração e alto rendimento de proteínas recombinantes, expressão estável é preferida. Por exemplo, linhas celulares que expressam de forma estável um anticorpo podem ser engenheiradas. Ao invés de usar vetores de expressão que contenham origens viróticas de replicação, células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado por elementos de controlo de expressão apropriados (por exemplo, locais de promotor, intensificador, sequências, transcrição, terminadores, poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. Após a introdução do ADN estrangeiro, células engenheiradas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido, e então são mudadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que células integrem de forma estável o plasmídeo nos seus cromossomas e cresçam para formar foci que, por sua vez, podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Este método pode vantajosamente ser usado para engenheirar linhas celulares que expressam o anticorpo. Estas linhas celulares engenheiradas podem ser especificamente úteis no rastreio e avaliação de antígenos de tumor que interagem diretamente ou indiretamente com o anticorpo.

Uma série de sistemas de seleção pode ser usada, incluindo, mas não limitada a cinase de timidina de vírus de herpes simples (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11:223), fosforibosil transferase de hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), e genes de fosforibosil transferase de adenina (Lowy *et al.*,

1980, Cell 22:817) podem ser utilizados em células tk-, hgp^{rt}- ou ap^{rt}-, respectivamente. Também, resistência antimetabolito pode ser usada como a base de seleção para os seguintes genes: DHFR, que confere resistência a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confere resistência ao aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu e Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; e Morgan e Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; Maio, 1993, TIB TECH 11(5): 155-215) e hyg^{ro}, que confere resistência a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de ADN recombinante que podem ser usados são descritos em Ausubel *et al.* (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli *et al.*, (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; Colberre-Gerapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1).

Os níveis de expressão de um anticorpo podem ser aumentados por amplificação de vetor (para uma análise, veja-se Bebbington e Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in ADN cloning, vol. 3. (Academic Press, Nova York, 1987)). Quando um marcador no sistema de vetor que expressa um anticorpo é amplificável, um aumento no nível de inibidor presente na cultura de célula hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Visto que a região amplificada está associada com a sequência de nucleótido do anticorpo, a produção do anticorpo irá,

também, aumentar (Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vetores de expressão, o primeiro vetor que codifica um polipéptido derivado de cadeia pesada e o segundo vetor que codifica um polipéptido derivado de cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que permitem expressão igual de polipéptidos de cadeia pesada e leve. Alternativamente, um vetor único pode ser usado para codificar tanto polipéptidos de cadeia pesada quanto de cadeia leve. Nestas situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar excesso de cadeia pesada isenta de tóxico (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). As sequências de codificação para as cadeias pesada e leve podem compreender ADNc ou ADN genómico.

Após o anticorpo ter sido expresso de forma recombinante, ele pode ser purificado usando qualquer método conhecido na técnica para purificação de um anticorpo, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iónica, afinidade, especificamente por afinidade para o antigénio específico após Proteína A, e cromatografia de coluna de dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas.

O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal.

Em qualquer caso, os anticorpos híbridos têm uma especificidade dupla, preferivelmente com um ou mais locais de ligação específicos para o hapteno de escolha ou um ou mais locais de ligação específicos para um antigénio alvo, por exemplo, um antigénio associado com um tumor, uma doença autoimune, um organismo infeccioso, ou outro estado de doença.

4.5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

A produção de anticorpos será ilustrada com referência

a anticorpos anti-CD30, mas ficará aparente aos peritos na especialidade que anticorpos para outros membros da família do recetor TNF podem ser produzidos e modificados de maneira semelhante. A utilização de CD30 para a produção de anticorpos é apenas exemplar e não objetiva ser limitativa.

O antigénio CD30 a ser usado para produção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do domínio extracelular de CD30 ou uma fração do mesmo, contendo o epítipo desejado. Alternativamente, células que expressam CD30 nas suas superfícies celulares (por exemplo, L540 (linha celular derivada de linfoma de Hodgkin com um fenótipo de célula T) e L428 (linha celular derivada de linfoma de Hodgkin com um fenótipo de célula B)) podem ser usadas para gerar anticorpos. Outras formas de CD30 úteis para gerar anticorpos ficarão aparentes aos peritos na especialidade.

Noutro exemplo, o antigénio ErbB2 a ser usado para produção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do domínio extracelular de ErbB2 ou uma fração do mesmo, contendo o epítipo desejado. Alternativamente, células que expressam ErbB2 nas suas superfícies celulares (por exemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobre-expressar ErbB2; ou uma linha celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, veja-se Stancovski *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8691-8695 (1991)) podem ser usadas para gerar anticorpos. Outras formas de ErbB2 úteis para gerar anticorpos ficarão aparentes aos peritos na especialidade.

(i) Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais são preferivelmente criados em animais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio relevante a uma proteína que seja imunogénica nas espécies a serem imunizadas, por exemplo, hemocianina do molusco "keyhole", albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de

tripsina de soja usando um agente bifuncional ou derivador, por exemplo, maleimidobenzoil sulfossuccinimida éster (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são grupos alquilo diferentes.

Animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos, ou derivados pela combinação, por exemplo, de 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e por injeção da solução intradermicamente em múltiplos locais. Um mês após os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em vários locais. Sete a 14 dias depois os animais são sangrados e o soro é analisado para titulação de anticorpo. Os animais são reforçados até o platô da titulação. Preferivelmente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugados com uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Conjugados também podem ser feitos em cultura de célula recombinante como fusões de proteína. Também agentes de agregação tais como alume são adequadamente usados para aumentar a resposta imunológica.

(ii) Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas. Dessa maneira, o modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos.

Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser feitos usando o método de hibridoma primeiramente descrito

por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), ou pode ser feito pelos métodos de ADN recombinantes (Patente US N° 4816567).

No método de hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado como descrito no presente documento acima para preparar linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que irão, especificamente, ligar-se à proteína usada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Linfócitos são, então, fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59- 103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas num meio de cultura adequado, que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma precursoras não fundidas. Por exemplo, se células de mieloma precursoras não possuem a transferase de enzima hipoxantina guanina fosforibosil (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para hibridomas tipicamente incluirão hipoxantina, amino proteína, e timidina (meio HAT), cujas substâncias impedem o crescimento de células deficientes de HGPRT.

Células de mieloma preferidas são aquelas que fundem eficientemente, suportam alto nível de produção estável de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio como o meio HAT. Entre estes, linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma de murino, tais como aquelas derivadas de tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis do Salk Institute Cell Distribution Center, São Diego, Califórnia, EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-

humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); e Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Mareei Dekker, Inc., Nova York, 1987)).

Meio de cultura no qual células de hibridoma estão a crescer é analisado quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por uma análise de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise "Scatchard" de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados pela limitação dos procedimentos de diluição e cultivados por métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura adequados para este objetivo incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos num animal.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite, ou soro por procedimentos convencionais de purificação de anticorpo tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese por gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

ADN, que codifica os anticorpos monoclonais, é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, através da utilização de sondas

de oligonucleótidos que são capazes de ligação específica a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos de murino). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que são, então, transfectados em células hospedeira tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células do ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que, pelo contrário, não produzem proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células de hospedeiro recombinante. Artigos de análise em expressão recombinantes na bactéria de ADN que codifica o anticorpo incluem Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5:256- 262 (1993) e Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

Anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fagos de anticorpo usando as técnicas descritas por McCafferty *et al.*, Nature, 348:552- 554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 -597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos de murino e humano, respetivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (intervalo de nM) por rearranjo de cadeia (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), assim como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Dessa maneira, estas técnicas são alternativas viáveis a técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpo monoclonal para isolamento de anticorpos monoclonais.

O ADN também pode ser modificado, por exemplo, através de substituição da sequência de codificação para domínios constantes humanos de cadeia pesada e cadeia leve no lugar das sequências de murino homólogo (Patente US N° 4816567; e Morrison, *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

81:6851), ou por união covalente com a sequência de codificação de imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulina.

Tipicamente, estes polipéptidos de não imunoglobulina são substituídos para os domínios constantes de um anticorpo, ou são substituídos para os domínios variáveis de um local de combinação de antígeno de um anticorpo, de modo a criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno, e um outro local de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno diferente.

(iii) Anticorpos Humanizados

Um anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos a partir de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácidos não humano são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente tomados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente executada através do método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988)), pela substituição de sequências de região hipervariável para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US N° 4.816.567) onde substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de região hipervariável, e possivelmente alguns resíduos FR, são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, para serem usados na produção de anticorpos

humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método denominado de "mais adequado", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é explorada contra a biblioteca inteira de sequências conhecidas de domínio variável humano. A sequência humana que é mais próxima àquela do roedor é, então, aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). Um outro método usa uma região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Os anticorpos podem ser humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Anticorpos humanizados podem ser preparados por um processo de análise das sequências precursoras e vários produtos humanizados conceituais, usando modelos tridimensionais das sequências precursoras e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares aos peritos na especialidade. Estão disponíveis programas de computador, que ilustram e mostram as estruturas prováveis de conformação tridimensional das sequências de imunoglobulina candidata selecionada. A inspeção destas apresentações permite analisar o papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar a seu antígeno. Desta maneira, resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências recipientes e importadas, de modo que as características

desejadas do anticorpo, tal como afinidade aumentada para o antígeno(s) alvo(s), seja atingida. De forma geral, os resíduos da região hipervariável estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação a antígeno.

Várias formas do anticorpo humanizado são consideradas. Por exemplo, o anticorpo humanizado pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um Fab. Alternativamente, o anticorpo humanizado pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo IgG1 intacto.

Os Exemplos descrevem a produção de um anticorpo anti-ErbB2 humanizado exemplar. O anticorpo humanizado pode, por exemplo, compreender resíduos da região hipervariável não humana incorporados num domínio pesado variável humano e podem, ainda, compreender uma substituição de região de estrutura (FR) numa posição selecionada do grupo consistindo de 69H, 71H e 73H, utilizando o sistema de numeração do domínio variável definido por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Numa forma de realização, o anticorpo humanizado compreende substituições de FR em duas ou todas as posições 69H, 71H e 73H. Um outro Exemplo descreve a preparação de anticorpo trastuzumab purificado da formulação HERCEPTIN®.

(iv) Anticorpos Humanos

Como uma alternativa para humanização, anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, é possível, agora, produzir animais transgênicos (por exemplo, ratinhos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada do anticorpo (J_H) em ratinhos quiméricos e mutantes da linha de germe resulta na inibição completa de produção

de anticorpo endógeno. A transferência do arranjo do gene de imunoglobulina da linha de germe nestes ratinhos mutantes de linha de germe resulta na produção de anticorpos humanos mediante desafio com antigénio. Veja-se, por exemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255- 258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); e Patentes US N° 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807.

Alternativamente, tecnologia de apresentação de fago (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores imunizados. De acordo com esta técnica, genes de domínio V de anticorpo são clonados na estrutura dentro de um gene de proteína de revestimento principal ou mínima de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e apresentada como fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula do fago. Devido ao fato da partícula filamentososa conter uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma do fago, seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exhibe aquelas propriedades. Dessa maneira, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A apresentação do fago pode ser executada numa variedade de formatos; para sua análise veja-se, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David. J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de gene V podem ser usadas para apresentação de fago. Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) isolaram um arranjo diverso de anticorpos de antioxaolona de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de ratinhos imunizados. Um repertório de genes V a partir de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um arranjo diverso de

antigénios (incluindo auto-antigénios) podem ser isolados essencialmente seguindo as técnicas descritas por Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), ou Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). Vejam também as Patentes US N° 5565332 e 5573905. Conforme discutido acima, anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (veja-se Patentes US N° 5567610 e 5229275). Anticorpos humanos anti-CD30 são descritos no pedido de Patente US N° de Série 10/338.366.

(v) Fragmentos de Anticorpo

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, por exemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem, agora, ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acordo com uma outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente de cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para produção de fragmentos de anticorpo ficarão aparentes para os técnicos especializados. Em outras formas de realização, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Veja-se documento WO 93/16185; Patente US N° 5.571.894; e Patente US N° 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", por exemplo, conforme descrito na Patente US N° 5.641.870, por exemplo. Estes fragmentos de anticorpo lineares podem ser monoespecíficos ou

biespecíficos.

(vi) Anticorpos Biespecíficos

Anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidade de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes. Anticorpos biespecíficos exemplares podem ligar-se a dois epítomos diferentes da proteína CD30. Alternativamente, um braço anti-CD30 pode ser combinado com um braço que se liga a recetores Fc para IgG (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) de modo a direccionar os mecanismos de defesa celular na célula que expressa CD30. Anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos a células que expressam CD30.

A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido à escolha aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas diferentes de anticorpo, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é usualmente feita por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante incómoda, e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos semelhantes são apresentados no documento WO 93/08829, e por Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de anticorpo-antigénio) são fundidos a sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão preferivelmente é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte da articulação, regiões CH2 e CH3. É preferido ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o

local necessário para ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. ADN que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se for desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona grande flexibilidade no ajuste de proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptido nas formas de realização quando proporções desiguais das três cadeias de polipéptido usadas na construção proporcionam os rendimentos ideais. É possível, portanto, inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipéptido num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipéptido em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não são de significância específica.

Num exemplo desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Descobriu-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, visto que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona uma via fácil de separação. Esta abordagem é apresentada no documento WO 94/04690. Para pormenores adicionais sobre geração de anticorpos biespecíficos, veja-se, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com uma outra abordagem descrita na Patente US N° 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser engenheirada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados de cultura

de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácido da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante às cadeias laterais grandes são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo pela substituição de cadeias laterais grandes de aminoácido por cadeias menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero em relação a outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos de fragmentos de anticorpo foram também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985) descreve um procedimento onde anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação ditiol de arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e impedir a formação intermolecular de bissulfeto. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é, então, convertido novamente em Fab' -tiol pela redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Um progresso recente facilitou a recuperação direta dos fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225

(1992) descreve a produção de uma molécula $F(ab')_2$ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' foi separadamente segregado de *E. coli* e submetido a acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico.

Várias técnicas para preparar e isolar fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente de cultura de célula recombinante foram também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos usando zíperes de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão de gene. Os homodímeros do anticorpo foram reduzidos na região de articulação para formar monómeros e, então, reoxidados para formar heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) proveu um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio de cadeia pesada variável (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é muito curto para permitir a formação de pares entre os dois domínios na mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares de um outro fragmento, formando, portanto, dois locais de ligação de antigénio. Uma outra estratégia para preparar fragmentos de anticorpo biespecífico pela utilização de dímeros de cadeia única Fv (sFv) foi também relatada. Veja-se Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Anticorpos com mais que duas valências são considerados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

(vii) Outras modificações em sequências de aminoácidos

Modificação(ões) de sequências de aminoácidos dos anticorpos descritos no presente documento são consideradas. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes de sequência de aminoácido dos anticorpos são preparadas pela introdução de alterações de nucleótido apropriadas no ácido nucleico do anticorpo, ou por síntese de péptido. Estas modificações incluem, por exemplo, deleções, e/ou inserções e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácido do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para obter a construção final, contanto que a construção final possua as características desejadas. As alterações no aminoácido também podem alterar processos pós-tradução do anticorpo, tais como alteração do número ou posição de locais de glicosilação.

Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são locais favorecidos para mutagênese é denominado de "mutagênese de rastreo de alanina" conforme descrito por Cunningham e Wells, Science, 244:1081-1085 (1989). No presente documento, um resíduo ou grupo de resíduos alvos é identificado (por exemplo, resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys, e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (mais preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antígeno. Aqueles locais de aminoácido que demonstram sensibilidade funcional em relação às substituições são, então, refinados pela introdução de variantes adicionais ou outras variantes, nos locais de substituição. Dessa maneira, embora o local para introdução de uma variação de sequência de aminoácido seja predeterminado, a natureza da mutação por si mesma não necessita ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num local dado,

mutagénese aleatória ou por rastreio de ala é conduzida no codão ou região alvo e as variantes de anticorpo expressas são exploradas quanto à atividade desejada.

Inserções de sequências de aminoácido incluem fusões de terminal de amino e/ou carboxilo variando em comprimento de um resíduo para os polipéptidos contendo uma centena ou mais resíduos, assim como inserções intrassequência de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções de terminal incluem um anticorpo com um resíduo N-terminal metionilo ou o anticorpo fundido a um polipéptido citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão do terminal N- ou C-do anticorpo a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipéptido que aumente a meia-vida do soro do anticorpo.

Um outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácido. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituída por um resíduo diferente. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações FR são também consideradas.

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são obtidas pela seleção de substituições que diferem significativamente no seu efeito na manutenção de (a) estrutura de suporte do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades de cadeia lateral comuns:

- (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, vai, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia:

gly, pro; e

(6) aromático: trp, tyr, phe.

Substituições não conservativas irão acarretar a troca de um membro de uma destas classes por uma outra classe.

Um tipo especialmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo precursor (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá propriedades biológicas melhoradas em relação ao anticorpo precursor do qual elas são geradas. Uma maneira conveniente para gerar estas variantes de substituição envolve a maturação de afinidade usando apresentação de fago. Resumidamente, vários locais de região hipervariável (por exemplo, 6-7 locais) sofrem mutações para gerar todas as substituições de amino possível em cada local. As variantes de anticorpo geradas desta maneira são apresentadas de uma maneira monovalente de partículas de fago filamentoso como fusões do produto do gene III de M13 embalados dentro de cada partícula. As variantes apresentadas de fago são, então, exploradas quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) conforme apresentado no presente documento. De modo a identificar locais de região hipervariável candidata para modificação, mutagénese de rastreio de alanina pode ser executada para identificar resíduos de região hipervariável que contribuem significativamente para ligação a antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura de cristal do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o antígeno. Estes resíduos de contacto e resíduos adjacentes são candidatos a substituição de acordo com as técnicas elaboradas no presente documento. Após estas variantes serem geradas, o painel de variantes é submetido ao rastreio conforme

descrito no presente documento e anticorpos com propriedades superiores numa ou mais análises relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Pode ser desejável modificar o anticorpo com relação à função de efector, por exemplo, de modo a aumentar a citotoxicidade mediada por célula dependente de antigénio (ADCC) e/ou complementar a citotoxicidade dependente (CDC) do anticorpo. Isto pode ser obtido pela introdução de uma ou mais substituições de aminoácido na região Fc do anticorpo. Alternativamente ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, permitindo, através disso, a formação de ligação de bissulfeto entre as cadeias nesta região. O anticorpo homodimérico gerado desta maneira pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou capacidade de eliminação de célula mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) aumentadas. Veja-se Caron *et al.* J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade anti-tumoral aumentada podem também ser preparados usando reticuladores heterobifuncionais conforme descrito por Wolff *et al.* Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, pode-se engenheirar um anticorpo que tenha duas regiões Fc e que pode, portanto, ter lise de complemento e capacidade de ADCC aumentadas. Veja-se Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Para aumentar a semivida do soro do anticorpo, pode ser incorporado um epítipo de ligação de recetor de salvamento no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) conforme descrito na Patente US N° 5739277, por exemplo. Conforme usado no presente documento, o termo "epítipo de ligação de recetor de salvamento" refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da semivida do soro *in vivo* da molécula de IgG.

(viii) Variantes de Glicosilação

Anticorpos no ADC da invenção podem ser glicosilados nas posições conservadas nas suas regiões constantes (Jefferis e Lund, (1997) *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright e Morrison, (1997) *TibTECH* 15:26-32). As cadeias laterais de oligossacáridos das imunoglobulinas afetam a função da proteína (Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe e Howard, (1990) *Biochem.* 29:4175-4180), e a interação intramolecular entre porções da glicoproteína que podem afetar a conformação e apresentaram superfície tridimensional da glicoproteína (Hefferis e Lund, *supra*; Wyss e Wagner, (1996) *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Oligossacáridos podem também servir para direcionar uma glicoproteína dada para certas moléculas com base em estruturas de reconhecimento específicas. Por exemplo, foi relatado que na IgG agalactosilada, a fração de oligossacárido "move-se" para fora do espaço inter-CH2 e resíduos terminais N-acetilglicosamina se tornam disponíveis para ligar proteína de ligação de manose (Malhotra *et al.*, (1995) *Nature Med.* 1:237- 243). A remoção por glicopeptidase dos oligossacáridos de CAMPATH-1H (um anticorpo IgG1 monoclonal de murino humanizado recombinante que reconhece o antígeno CDw52 de linfócitos humanos) produzidos nas células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) resultou numa redução completa na lise mediada por complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311- 1318), enquanto a remoção seletiva de resíduos de ácido siálico usando neuraminidase não resultou em perda de DMCL. Foi também relatado que glicosilação de anticorpos afeta a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em especial, foi relatado que células CHO com expressão regulada por tetraciclina de p(1,4)-N-acetilglicosaminil transferase III (GnTIII), uma formação de catalisação de glicosil transferase de bissecção de GlcNAc, tiveram atividade ADCC melhorada (Umana *et al.*

(1999) Mature Biotech. 17:176-180).

Glicosilação de anticorpos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N- ligada refere-se à união da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripéptido asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para união enzimática da fração de hidrato de carbono para a cadeia lateral de asparagina. Dessa maneira, a presença de qualquer uma destas sequências de tripéptido num polipéptido cria um local de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada refere-se à união de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um ácido hidroxiamínico, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

Variantes de glicosilação de anticorpos são variantes nas quais o padrão de glicosilação de um anticorpo é alterado. Por alteração entende-se a deleção de uma ou mais porções de hidrato de carbono encontradas no anticorpo, a adição de uma ou mais porções de hidrato de carbono ao anticorpo, a alteração da composição de glicosilação (padrão de glicosilação), a extensão da glicosilação, etc.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente obtida através da alteração da sequência de aminoácido, de modo que ela contenha uma ou mais das sequências de tripéptido descritas acima (para locais de glicosilação N-ligada). A alteração pode também ser feita pela adição, ou substituição, de um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação O-ligada). De maneira semelhante, a remoção de locais de glicosilação pode ser obtida por alteração de aminoácido dentro dos locais de glicosilação nativos do anticorpo.

A sequência de aminoácidos é usualmente alterada pela alteração da sequência de aminoácido subjacente. Estes

métodos incluem, mas não se limitam a isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido de ocorrência natural) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleótido (ou direcionada ao local), mutagênese de PCR, e mutagênese de cassete de uma variante preparada anteriormente ou de uma versão não variante do anticorpo.

A glicosilação (incluindo padrão de glicosilação) de anticorpos pode também ser alterada sem alterar a sequência de aminoácido ou a sequência de nucleótido subjacente. A glicosilação depende grandemente da célula hospedeira usada para expressar o anticorpo. Visto que o tipo de célula usado para expressão de glicoproteína recombinante, por exemplo, anticorpos, como potencial terapêutico está raramente na célula nativa, variações significativas no padrão de glicosilação dos anticorpos podem ser esperadas. Veja-se, por exemplo, Hse et al., (1997) J. Biol. Chem. 272-9062-9070. Além da escolha de células hospedeiras, fatores que afetam a glicosilação durante a produção recombinante de anticorpos incluem o modo de crescimento, formulação do meio, densidade da cultura, oxigenação, pH, esquemas de purificação e semelhantes. Vários métodos foram propostos para alterar o padrão de glicosilação atingido num organismo hospedeiro específico, incluindo a introdução ou sobre-expressão de certas enzimas envolvidas na produção de oligossacáridos (Patentes US N° 5047335; 5510161; 5278299). Glicosilação, ou certos tipos de glicosilação, podem ser enzimaticamente removidos da glicoproteína, por exemplo, usando endoglicosidase H (Endo H). Além disso, a célula hospedeira recombinante pode ser engenheirada geneticamente, por exemplo, tornando-as defeituosas no processamento de certos tipos de polissacáridos. Estas e técnicas semelhantes são bem conhecidas na técnica.

A estrutura de glicosilação de anticorpos pode ser prontamente analisada por técnicas convencionais de análise

de hidrato de carbono, incluindo cromatografia de lectina, RMN, espectrometria de massa, HPLC, GPC, análise de composição de monossacárido, digestão enzimática sequencial, e HPAEC- PAD, que usa cromatografia de troca aniônica de alto pH para separar oligossacáridos com base na carga. Métodos para libertar oligossacáridos para objetivos analíticos são também conhecidos, e incluem, sem limitação, tratamento enzimático (comumente executado usando péptido-N-glicosidase F/endo- β -galactosidase), eliminação usando ambiente alcalino adstringente para libertar principalmente estruturas O-ligadas, e métodos químicos usando hidrazina anidra para libertar tanto oligossacáridos N- quanto O-ligados.

4.5.2a RASTREIO DE CONJUGADO DE ANTICORPO-FÁRMACO (ADC)

Animais transgênicos e linhas celulares são especialmente úteis no rastreio de conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) que têm potencial como tratamentos profiláticos ou terapêuticos de doenças ou distúrbios envolvendo a sobre-expressão de proteínas incluindo Lewis Y, CD30, CD40, e CD70. Animais transgênicos e linhas celulares são especialmente úteis no rastreio de conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) que têm potencial como tratamentos profiláticos ou terapêuticos de doenças ou distúrbios envolvendo a sobre-expressão de HER2 (documento US 6632979). O rastreio de um ADC útil pode envolver a administração de ADC candidato numa variedade de doses para o animal transgênico, e a análise em vários pontos no tempo dos efeitos do ADC na doença ou distúrbio que está a ser avaliada. Alternativamente, ou adicionalmente, o fármaco pode ser administrado antes ou simultaneamente com a exposição a um indutor da doença, se aplicável. ADC candidato pode ser explorado serialmente e individualmente, ou em paralelo sob meio ou formato de rastreio de alto-resultado. A taxa na qual ADC pode ser explorado para utilidade em tratamentos profiláticos ou terapêuticos de

doenças ou distúrbios é limitada apenas pela taxa de síntese ou metodologia de rastreio, incluindo a detecção/medição/análise de dados.

Um exemplo é um método de rastreio que compreende (a) transplantar células de uma linha celular cancerígena de célula renal estável num animal não humano, (b) administrar um fármaco ADC candidato ao animal não humano e (c) determinar a capacidade do candidato para inibir a formação de tumores da linha celular transplantada.

Um outro exemplo é um método de rastreio que compreende (a) colocar em contacto células de uma linha celular de doença de Hodgkin estável com um candidato a fármaco ADC e (b) avaliar a capacidade do candidato ADC para bloquear a ativação do ligando de CD40.

Um outro exemplo é um método de rastreio que compreende (a) colocar em contacto células de uma linha celular de doença de Hodgkin com um fármaco ADC candidato e (b) avaliar a capacidade do candidato ADC para induzir a morte da célula. Numa forma de realização a capacidade do ADC candidato para induzir apoptose é avaliada.

Um exemplo um método de rastreio que compreende (a) transplantar células de uma linha celular cancerígena estável num animal não humano, (b) administrar um fármaco ADC candidato ao animal não humano e (c) determinar a capacidade do candidato para inibir a formação de tumores da linha celular transplantada. A invenção também se refere a um método de rastreio de candidatos ADC para o tratamento de uma doença ou distúrbio caracterizada pela sobre-expressão de HER2 que compreende (a) colocar em contacto células de uma linha celular cancerígena de mama estável com um fármaco candidato e (b) avaliar a capacidade do ADC candidato para inibir o crescimento da linha celular estável.

Um outro exemplo é um método de rastreio que compreende (a) colocar em contacto células de uma linha

celular cancerígena estável com um fármaco ADC candidato e (b) avaliar a capacidade do ADC candidato para bloquear a ativação de HER2. Numa forma de realização, a capacidade do ADC candidato para bloquear a ligação de herregulina é avaliada. Numa outra forma de realização, a capacidade do ADC candidato para bloquear fosforilação de tirosina estimulada por ligando é avaliada.

Também é descrito um método de rastreio que compreende (a) colocar em contacto células de uma linha celular cancerígena estável com um fármaco ADC candidato e (b) avaliar a capacidade do ADC candidato para induzir a morte da célula. Numa forma de realização, a capacidade do ADC candidato para induzir apoptose é avaliada.

Também é descrito um método de rastreio que compreende (a) administrar um fármaco ADC candidato a um mamífero não humano transgénico que sobre-expressa nas suas células de glândula mamária uma proteína HER2 humana ou um fragmento da mesma, em que este mamífero transgénico possui, integrada de forma estável no seu genoma, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína HER2 humana nativa ou um fragmento da mesma que tem a atividade biológica de HER2 humano nativo operativamente ligada a sequências reguladoras de transcrição que direcionam a sua expressão para a glândula mamária, e desenvolve um tumor de mama que não responde ou responde muito pouco a tratamento de anticorpo anti-HER2, ou a um mamífero não humano que possui um tumor transplantado do referido mamífero não humano transgénico; e (b) avaliar o efeito do ADC candidato na doença ou distúrbio alvo. Sem limitações, a doença ou distúrbio pode ser um cancro que sobre-expressam HER2, tal como cancro de mama, de ovário, estomacal, do endométrio, da glândula salivar, pulmonar, renal, do cólon, tiroide, pancreático e da bexiga. O cancro preferivelmente é cancro de mama que expressou HER2 em pelo menos cerca de 500.000 cópias por célula, mais preferivelmente pelo menos cerca de

2.000.000 cópias por célula. Fármaco ADC candidatos podem, por exemplo, ser avaliados quanto à sua capacidade para induzir morte e/ou apoptose de célula, usando métodos de análise bem conhecidos na técnica e descritos no presente documento posteriormente.

Num exemplo, ADC candidatos são explorados através de sua administração ao animal transgénico numa variedade de doses, e da avaliação da resposta fisiológica do animal aos compostos com o passar do tempo. A administração pode ser oral, ou por injeção adequada, dependendo da natureza química do composto que está a ser avaliado. Em alguns casos, pode ser apropriado administrar o composto em conjunto com co-fatores que intensificariam a eficácia do composto. Se linhas celulares derivadas dos animais transgénicos em questão são usadas para explorar compostos úteis no tratamento de vários distúrbios, os compostos de teste são adicionados ao meio de cultura de célula num momento apropriado, e a resposta celular ao composto é avaliada com o passar do tempo usando análises bioquímicas e/ou histológicas apropriadas. Em alguns casos, pode ser apropriado aplicar o composto de interesse ao meio de cultura em conjunto com co-fatores que intensificariam a eficácia do composto.

Dessa maneira, são descritas no presente documento análises para a identificação de ADC que especificamente se direcionam e se ligam à proteína alvo, cuja presença está correlacionada com função celular anormal, e na patogénese de proliferação celular e/ou diferenciação que está relacionada de forma causal com o desenvolvimento de tumores.

Para identificar um ADC que bloqueie ativação de ligando de um recetor de ErbB (por exemplo, ErbB2), a capacidade do composto para bloquear ligação de ligandos de ErbB a células que expressam o recetor ErbB (ErbB2) (por exemplo, em conjunto com um outro recetor ErbB com o qual o

recetor ErbB de interesse forma um hetero-oligómero ErbB) pode ser determinada. Por exemplo, células isoladas do animal transgénico que sobre-expressam HER2 e transfectadas para expressar um outro recetor ErbB (com o qual HER2 forma hetero-oligómero) podem ser incubadas, isto é, cultivadas com ADC e então expostas a ligando de ErbB marcado. A capacidade do composto para bloquear ligação de ligando ao recetor ErbB no hetero-oligómero ErbB pode, então, ser avaliada.

Por exemplo, a inibição de ligação de herregulina (HRG) a linhas celulares de tumor de mama, que sobre-expressam HER2 e estabelecida dos mamíferos não humanos transgénicos (por exemplo, ratinho) no presente documento, pelo ADC candidato pode ser executada usando culturas de camada única em gelo num formato de placa de 24 poços. Anticorpos monoclonais anti-ErbB2 podem ser adicionados a cada poço e incubados durante 30 minutos. rHRG β ₁₇₇₋₂₂₄ marcado com ¹²⁵I (25.000 cpm) pode, então, ser adicionado, e a incubação pode ser continuada durante 4 a 16 horas. Curvas de resposta de dose podem ser preparadas e um valor IC₅₀ (atividade citotóxica) pode ser calculada para o composto de interesse.

Alternativamente, ou adicionalmente, a capacidade de um ADC para bloquear fosforilação de tirosina estimulada por ligando de ErbB de um recetor ErbB presente num hetero-oligómero ErbB pode ser avaliada. Por exemplo, linhas celulares estabelecidas a partir dos animais transgénicos no presente documento, podem ser incubadas com um ADC de teste e então avaliadas quanto à atividade de fosforilação de tirosina dependente de ligando de ErbB usando um anticorpo monoclonal antifosfotirosina (que é opcionalmente conjugado com um rótulo detetável). A análise de ativação do recetor de cinase descrita na Patente US N° 5766863 está também disponível para determinar ativação de recetor ErbB e bloqueio daquela atividade pelo composto.

Num exemplo, é possível explorar ADC que inibe a estimulação de HRG de fosforilação de tirosina p180 em células MCF7 essencialmente conforme descrito a seguir. Por exemplo, uma linha celular estabelecida de um animal transgênico HER2 pode ser colocada em placas de 24 poços e o composto pode ser adicionado a cada poço e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente; então rHRG β_r 177-224 pode ser adicionado a cada poço até uma concentração final de 0,2 nM, e a incubação pode ser continuada durante cerca de 8 minutos. O meio pode ser aspirado de cada poço, e reações podem ser paradas pela adição de 100 μ l de tampão de amostra SDS (5 % de SDS, 25 mM DTT, e 25 mM de Tris-HCl, pH 6,8). Cada amostra (25 μ l) pode passar por eletroforese num gel gradiente de 4-12 % (Novex) e então transferidos eletroforeticamente para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. Immunoblots de antifosfotirosina (a 1 μ g/ml) podem ser desenvolvidas, e a intensidade da banda reativa predominante a M_r -180.000 pode ser quantificada por densitometria de refletância. Um método alternativo para avaliar a inibição de fosforilação de recetor é a análise KIRA (ativação de recetor de cinase) de Sadick *et al.* (1998) Jour. of Pharm. and Biomed. Anal. Alguns dos anticorpos monoclonais bem estabelecidos contra HER2 que são conhecidos por inibir a estimulação de HRG de fosforilação de tirosina p180 podem ser usados como controlo positivo nesta análise. Uma curva dose-resposta para a inibição de estimulação de HRG da fosforilação de tirosina p180, conforme determinado por densitometria de refletância, pode ser preparada e um IC₅₀ para o composto de interesse pode ser calculado.

Os efeitos inibidores de crescimento de um teste ADC em linhas celulares derivadas de um animal transgênico HER2, por exemplo, essencialmente conforme descrito em Schaefer *et al.* (1997) Oncogene 15:1385-1394, podem também ser avaliados. De acordo com esta análise, as células podem

ser tratadas com um composto de teste em várias concentrações durante 4 dias e coradas com violeta cristal ou corante de redox "Alamar Blue". A incubação com o composto pode mostrar um efeito inibidor no crescimento nesta linha celular semelhante àquele apresentado por anticorpo monoclonal 2C4 em células MDA-MB-175 (Schaefer *et al.*, supra). Numa forma de realização adicional, HRG exógeno não inverterá significativamente esta inibição.

Para identificar compostos inibidores de crescimento, os quais especificamente se direcionam para um antígeno de interesse, pode ser efetuado rastreio para compostos que inibam o crescimento de células cancerígenas que sobre-expressam um antígeno de interesse derivado de animais transgênicos, e a análise descrita na Patente US N° 5677171 pode ser executada. De acordo com esta análise, células cancerígenas que sobre-expressam o antígeno de interesse são cultivadas numa mistura 1:1 de meio F12 e DMEM suplementado com 10 % de soro bovino, glutamina e penicilina estreptomicina. As células são laminadas a 20.000 células num placa de cultura de célula de 35 mm (placa 2 ml/35 mm) e o composto de teste é adicionado em várias concentrações. Após seis dias, o número de células, comparado com células não tratadas, é contado usando um contador de célula COULTER™ eletrónico. Os compostos que inibem o crescimento de célula em cerca de 20-100 % ou cerca de 50-100 % podem ser selecionados como compostos inibidores de crescimento.

Para selecionar compostos que induzam morte celular, perda de integridade de membrana conforme indicado por, por exemplo, PI, absorção de azul tripano ou 7AAD pode ser avaliada em relação ao controlo. A análise de absorção de PI usa células isoladas do tecido de tumor de interesse de um animal transgênico. De acordo com esta análise, as células são cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) suplementado com 10 %

de FBS desativado por calor (Hyclone) e 2 mM de L-glutamina. Dessa maneira, a análise é executada na ausência de complemento e células de efector imunes. As células são semeadas numa densidade de 3×10^6 por placa em placas de 100 x 20 mm e deixadas anexar durante a noite. O meio é, então, removido e substituído com meio fresco sozinho ou meio contendo as várias concentrações do composto. As células são incubadas durante um período de 3 dias. Após cada tratamento, monocamadas são lavadas com PBS e separadas por tripsinização. Células são, então, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, a conta suspensa novamente em 3 ml de tampão de ligação frio Ca^{2+} (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) e divididos em tubos de 12 x 75 mm tapados de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupos de tratamento) para remoção de aglomerados de célula. Os tubos, então, recebem PI (10 µg/ml). Amostras podem ser analisadas usando um citômetro de fluxo FACSCAN™ e software CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Aqueles compostos que induzem níveis estatisticamente significativos de morte celular conforme determinado por absorção de PI podem ser selecionados como compostos indutores de morte celular.

Para selecionar compostos que induzam apoptose, é executada uma análise de ligação de anexina usando células estabelecidas de tecido de tumor de interesse do animal transgênico. As células são cultivadas e semeadas em placas conforme discutido no parágrafo anterior. O meio é, então, removido e substituído com meio fresco sozinho ou meio contendo 10 µg/ml do conjugado de anticorpo-fármaco (ADC). Após um período de incubação de três dias, monocamadas são lavadas com PBS e separadas por tripsinização. Células são, então, centrifugadas, suspensas novamente em tampão de ligação Ca^{2+} e divididas em tubos conforme discutido acima para a análise de morte celular. Tubos, então, recebem anexina marcada (por exemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml).

Amostras podem ser analisadas usando um citómetro de fluxo FACSCAN™ e software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Os compostos que induzem níveis estatisticamente significativos de ligação de anexina em relação ao controlo são selecionados como compostos indutores de apoptose.

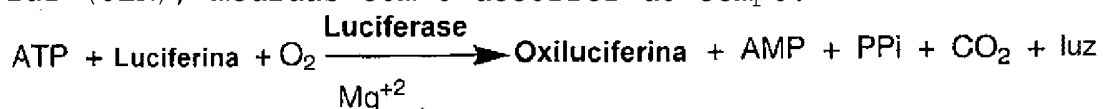
4.5.3 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

De forma geral, a atividade citotóxica ou citostática de um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) é medida por: exposição de células de mamífero, que possuem proteínas do recetor para o anticorpo do ADC, num meio de cultura de célula; cultivo das células durante um período de cerca de 6 horas a cerca de 5 dias; e medida da viabilidade da célula. Os ensaios *in vitro* à base de células foram usados para medir a viabilidade (proliferação), citotoxicidade, e indução de apoptose (ativação de caspase) do ADC da invenção.

A potência *in vitro* de conjugados de anticorpo-fármaco foi medida por um ensaio de proliferação celular (Exemplo 19, Figuras 7-10). O Ensaio de Viabilidade de Célula Luminescente CellTiter-Glo® está comercialmente disponível (Promega Corp., Madison, WI), método de análise homogénea com base na expressão recombinante de luciferase de *Coleoptera* (Patente US N° 5583024; 5674713 e 5700670). Este ensaio de proliferação celular determina o número de células viáveis na cultura com base na quantificação do ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas (Crouch *et al.* (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, Patente US N° 6602677). O Ensaio de CellTiter-Glo® foi conduzido no formato de 96 poços, tornando-a recetível para rastreio automatizada de alto resultado (HTS) (Cree *et al.* (1995) Anti Cancer Drugs 6:398-404). O procedimento de análise homogénea envolve a adição do reagente único (Reagente Celltiter-Glo®) diretamente nas células cultivadas no meio suplementado com soro. As etapas de lavagem de célula,

remoção do meio e pipetagens múltiplas não são requeridas. O sistema detecta uma quantidade tão pequena quanto 15 células/poço num formato de 384 poços em 10 minutos após adição de reagente e mistura. As células podem ser tratadas continuamente com ADC, ou podem ser tratadas e separadas de ADC. De forma geral, células tratadas brevemente, isto é, 3 horas, mostraram os mesmos efeitos de potência que as células tratadas de forma contínua.

O formato "adição-mistura-medição" homogêneo resulta em lise celular e geração de um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente. A quantidade de ATP é diretamente proporcional ao número de células presentes na cultura. O Ensaio CellTiter-Glo® gera um sinal luminescente "tipo brilho", produzido pela reação de luciferase, que possui uma semivida geralmente maior que cinco horas, dependendo do tipo de célula e meio usados. Células viáveis são refletidas em unidades de luminescência relativas (ULR). O substrato, Beetle Luciferin, é oxidativamente descarboxilado por luciferase de vaga-lume com conversão concomitante de ATP para AMP e geração de fótons. A semivida estendida elimina a necessidade de usar injetores de reagente e proporciona flexibilidade para processamento de modo contínuo ou de lote de múltiplas lâminas. Este ensaio de proliferação celular pode ser usado com vários formatos de poços múltiplos, por exemplo, formato de 96 ou 384 poços. Dados podem ser registados pelo luminómetro ou dispositivo de imagem de câmara CCD. A saída de luminescência é apresentada como unidades relativas de luz (ULR), medidas com o decorrer do tempo.



Os efeitos anti-proliferativos de conjugados de anticorpo-fármaco foram medidos pela proliferação celular, análise de morte celular *in vitro* acima contra quatro

linhas celulares de tumor de mama diferentes (Figuras 7-10). Valores de IC_{50} foram estabelecidos para SK-BR-3 e BT-474 que são conhecidos por sobre-expressar a proteína do recetor HER2. O quadro 2b mostra as medições de potência (IC_{50}) de conjugados de anticorpo-fármaco exemplares no ensaio de proliferação celular contra células BT-474.

Conjugados de anticorpo-fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab; e Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab não inibiram a proliferação de células MCF-7 (Figura 9).

Conjugados de anticorpo-fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab; e Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab não inibiram a proliferação de células MDA-MB-468 (Figura 10).

Células MCF-7 e MDA-MB-468 não sobre-expressam a proteína de recetor HER2. Os conjugados de anticorpo-fármaco anti-HER2 descritos no presente documento, portanto, mostram seletividade para inibição de células que expressam HER2.

Quadro 2a Células SK-BR-3

Conjugado de Anticorpo-Fármaco H = Trastuzumab ligado através de cisteína [cys] exceto onde indicado	IC_{50} (μ g ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,0035-0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,006-0,007
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,006

H-MC- (N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8,8 MMAE/Ab	0,018
H-MC- MMAE, 4,6 MMAE/Ab	0,05
H-MC- (L)val- (L)cit-PAB-MMAE, 8,7 MMAE/Ab	0,0003
H-MC- (D)val- (D)cit-PAB-MMAE, 8,2 MMAE/Ab	0,02
H-MC- (D)val- (L)cit-PAB-MMAE, 8,4 MMAE/Ab	0,0015
H-MC- (D)val- (L)cit-PAB-MMAE, 3,2 MMAE/Ab	0,003
H-Trastuzumab	0,083
H-vc-MMAE, ligado via uma lisina [lys]	0,002
H-phe-lys-MMAE, ligado via uma lisina [lys]	0,0015
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,004
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,01
7C ₂ -MC-vc-PAB-MMAF, 4,0 MMAF/Ab	0,01
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1,5 MMAF/Ab	0,02
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-

Quadro 2b células BT474

Conjugado de Anticorpo-Fármaco H = trastuzumab ligado via uma cisteína [cys]	IC ₅₀ (µg ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,02-0,05
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,015

H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,010
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,00015
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8,8 MMAE/Ab	0,04
H-MC-MMAE, 4,6 MMAE/Ab	0,07
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,008
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,01
7C ₂ -MC-vc-PAB-MMAF, 4,0 MMAF/Ab	0,015
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1,5 MMAF/Ab	0,04
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-
H = trastuzumab 7C₂ = anticorpo de murino anti-HER2 que se liga a um epítopo diferente de trastuzumab. Fc8 = mutante que não se liga a FcRn Hg = 4D5 humanizado de comprimento total "sem articulação", com cisteínas de cadeia pesada articuladas que sofreram mutação em serinas. Expressa em <i>E. coli</i> (portanto, não glicosilada). Fab Anti-TF = fragmento de anticorpo de fator anti-tecido * atividade contra células MDA-MB-468	

Numa descoberta surpreendente e inesperada, os resultados de atividade de proliferação celular *in vitro* do ADC nos Quadros 2a e 2b mostram, de forma geral, que ADC com um número médio baixo de frações de fármaco por anticorpo mostrou eficácia, por exemplo, IC₅₀ < 0,1 µg ADC/ml. Os resultados sugerem que pelo menos para ADC trastuzumab, a proporção ideal de frações de fármaco por anticorpo pode ser menor que 8, e pode ser de cerca de 2 a cerca de 5.

4.5.4 DEPURAÇÃO E ESTABILIDADE PLASMÁTICA *IN VIVO*

Depuração e estabilidade plasmática farmacocinética de ADC foram investigadas em ratos e macacos cynomolgus. A concentração plasmática foi medida com periodicamente. O

quadro 2c mostra dados de farmacocinética de conjugados de anticorpo-fármaco e outras amostras dosadas em ratos. Ratos são um modelo não específico para anticorpo de recetor ErbB, visto que não se tem conhecimento de que o rato expresse proteínas do recetor HER2

Quadro 2c Farmacocinética em ratos

H = trastuzumab ligado via uma cisteína [cys] exceto onde indicado 2 mg/kg dose exceto onde indicado					
Dose de amostra mg/kg	AUCinf dia* µg/ml	CL ml/dia/kg	Cmax µg/ml	Termo T½. dias	% de Conj.
H-MC-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	78,6	26,3	39,5	5,80	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,1	64,4	33,2	3,00	
H-MC-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	170	12,0	47,9	8,4	50,0
H-MC-vc-PAB-MMAF (Conj.)	83,9	24,0	44,7	4,01	
H-MC-MMAE (Total Ab)	279	18,9	79,6	7,65	33
H-MC-MMAE (Conj.) 5 mg/kg	90,6	62,9	62,9	4,46	
H-MC-MMAF (Total Ab)	299	6,74	49,1	11,6	37
H-MC-MMAF (Conj.)	110	18,26	50,2	4,54	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-Me-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	186	10,8	46,9	8,3	45,3
H-Me-vc-PAB-MMAF (Conj.)	84,0	23,8	49,6	4,3	
H-Me-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	135	15,0	44,9	11,2	23,8
H-Me-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,9	63,8	45,2	3,0	
H-MC-vc-MMAF wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Total Ab)	107	19,2	30,6	9,6	38,1
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Conj.)	40	50,4	33,7	3,98	
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Total Ab	135,1	15,0	44,9	11,2	23,8
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Conj.	31,9	63,8	45,2	2,96	

H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, Total Ab	88,2	22,8	33,8	10,5	38,3
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, Conj.	33,6	59,8	36,0	4,43	
H-MC-vc-PAB-MMAE, Total Ab	78,6	26,3	39,5	5,8	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE, Conj. H ligado a MC por lisina [lys]	31,1	64,4	33,2	3,00	
MMAF 200 µg/kg	0,99	204	280	0,224	–
MMAE 206 µg/kg	3,71	62,6	649	0,743	–
HER F(ab') ₂ -MC-vc-MMAE, Total Ab	9,3	217	34,4	0,35	95
HER F(ab') ₂ -MC-vc-MMAE, Conj.	8,8	227	36,9	0,29	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Total Ab	43,8	46,2	38,5	1,49	68
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Conj.	29,9	68,1	34,1	1,12	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAE, Total Ab	71,5	70,3	108	1,18	59
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAE, Conj.	42,2	118,9	114	0,74	
4D5-H-Fab	93,4	53,9	133	1,08	–
H-MC-vc-PAB-MMAF, Total Ab	170	12,03	47,9	8,44	49,5
H-MC-vc-PAB-MMAF, Conj.	83,9	23,96	44,7	4,01	
H-MC-vc-PAB-MMAF-DMAEA, Total Ab	211	9,8	39,8	8,53	34,3
H-MC-vc-PAB-MMAF-DMAEA, Conj.	71,5	28,2	38,8	3,64	
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, Total Ab	209	9,75	53,2	8,32	29,7
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, Conj.	63,4	31,8	34,9	4,36	

Dose de 2 mg/kg exceto onde mencionado de outro modo. AUC_{inf} é a área sob a curva de concentração plasmática-tempo do momento da dosagem até o infinito e é uma medida da exposição total à entidade medida (fármaco, ADC). CL é definida como o volume de plasma depurado da entidade medida em unidade de tempo e é expressa pela normalização ao peso corporal. O termo $T_{1/2}$ é a semivida do fármaco no corpo medida durante sua fase de eliminação. O termo % de

Conj. é a quantidade relativa de ADC comparada com anticorpo total detetado por testes separados de imunoafinidade ELISA ("Analytical Methods for Biotechnology Products", Ferraiolo et al., páginas 85-98 no Pharmacokinetics of Drugs (1994) P.G. Welling e L.P. Balant, Eds., Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 110, Springer-Verlag. O cálculo da % de Conj. é simplesmente $AUC_{inf} \text{ de ADC} + AUC_{inf} \text{ total de Ab}$, e é um indicador geral de estabilidade do ligante, embora outros fatores e mecanismos possam estar presentes.

A Figura 11 mostra um gráfico de um estudo de depuração de concentração plasmática após administração dos conjugados de anticorpo- fármaco: H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG e H-MC-vc-PAB-MMAF a ratos Sprague-Dawley. Concentrações totais de anticorpo e ADC foram medidas ao longo do tempo.

A Figura 12 mostra um gráfico de um estudo de duas fases de depuração de concentração plasmática onde ADC foi administrado em dosagens diferentes e as concentrações de anticorpo e ADC totais foram medidas ao longo do tempo.

EFICÁCIA *IN VIVO*

A eficácia *in vivo* do ADC da invenção foi medida por um modelo de ratinho de explante transgênico com alta expressão de HER2. Um aloenxerto foi propagado do ratinho transgênico Fo5 mmtv que não responde, ou responde muito pouco, a terapêutica com HERCEPTIN®. Os indivíduos foram tratados uma vez com ADC e monitorizados durante 3-6 semanas para medir o tempo para o tumor dobrar, registo de morte celular, e diminuição do tumor. Acompanhamento resposta-dose e experiências de doses múltiplas foram conduzidos.

O tumor aparece prontamente em ratinhos transgênicos que expressam uma forma ativada por mutação de neu, um homólogo de rato para HER2, mas o HER2 que é sobre-expresso nos cancros de mama não sofre mutação e a formação do tumor é muito menos robusta em ratinhos transgênicos que sobre-

expressam HER2 sem mutação (Webster *et al.* (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5:69-76).

Para melhorar a formação tumoral com HER2 sem mutação, foram produzidos ratinhos transgênicos usando plasmídeo ADNc HER2 nos quais uma ATG a montante foi deletada de modo a impedir o início de tradução nestes codões ATG a montante, que, caso contrário, reduziriam a frequência de início de tradução do codão de início autêntico a jusante de HER2 (por exemplo, veja-se Child *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:24335-24341). Adicionalmente, um intrão quimérico foi adicionado à extremidade 5', que deveria, também, aumentar o nível de expressão conforme relatado anteriormente (Neuberger e Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713; Buchman e Berg (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:4395; Brinster *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836). O intrão quimérico foi derivado de um vetor Promega, vetor de expressão de pCI-neo de mamífero (bp 890-1022). A extremidade 3' de ADNc é flanqueada por exões de crescimento humano 4 e 5, e sequências de poliadenilação. Além do mais, ratinhos FVB foram usados, porque esta estirpe é mais suscetível a desenvolvimento tumoral. O promotor de MMTV-LTR foi usado para garantir expressão de HER2 específica de tecido na glândula mamária. Os animais foram alimentados com a dieta AIN 76A de modo a aumentar a suscetibilidade à formação de tumores (Rao *et al.* (1997) *Breast Cancer Res. and Treatment* 45:149-158).

Quadro 2d Medições tumorais em modelo de ratinho com aloenxerto - tumor mamário MMTV-HER2 Fo5, ratinho nu atímico

dose única no dia 1 (T = 0) exceto onde indicado H = trastuzumab ligado via uma cisteína [cys] exceto onde indicado						
Fármacos de amostra por anticorpo	Dose	Ti	PR	CR	Tempo de duplicação tumoral (dias)	Registo médio de mortalidade celular
Veículo					2-5	0
H-MC-vc-PAB-MMAE 8,7 MMAE/Ab	1250 µg/m ²	5/5	4/7	0/7	18	1,5
H-MC-vc-PAB-MMAF 3,8 MMAF/Ab	555 µg/m ²	2/5	2/7	5/7	69	6,6
H-MC (Me) -vc-PAB-MMAF					>50	6,4
H-MC-MMAF 4,8 MMAF/Ab	9,2 mg/kg Ab 550 µg/m ² a 0, 7, 14 e 21 dias	7/7	6/7	0/7	63	9
H-MC-MMAF 4,8 MMAF/Ab	14 mg/kg Ab 840 µg/m ² a 0, 7, 14 e 21 dias	5/5	5/7	2/7	>63	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	3,5 mg/kg Ab 300 µg/m ² a 0, 21 e 42 dias	5/6	1/7	3/7	>36	

H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	4,9 mg/kg Ab 425 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 0, 21 e 42 dias	4/7	2/7	5/7	>90	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	6,4 mg/kg Ab 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 0, 21 e 42 dias	3/6	1/7	6/7	>90	
H-(L)val-(L)cit-MMAE 8,7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	1/7	0/7	15,2	1,1
H-MC-MMAE 4,6 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	4	0,1
H-(D)val-(D)cit-MMAE 4,2 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	
H-(D)val-(L)cit-MMAE 3,2 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	0/7	0/7	9	0,6
H-MC(Me)-vc-MMAE 3,0 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	3/7	0/7	17	1,2
H-(L)val-(D)cit-MMAE 3,5 MMAE/Ab	12 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0,2
H-vc-MMAE 8,7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7			17	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	1 mg/kg	7/7			3	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	3 mg/kg	7/7			>17	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	>17	
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg	3/6	1/7	6/7	81	7,8
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg q3 sem x 3	0/5	0/7	7/7	81	7,9
H-vc-MMAF (lote 1)	10 mg/kg	4/6	2/8	5/8		
H-vc-MMAF (lote 2)	10 mg/kg	7/8	1/8	1/8		

H-MC-MMAF	10 mg/kg 550 µg/m ²	8/8	1/8	0/8	18	
H-(Me)-vc-MMAF	10 mg/kg	3/7	2/8	5/8		
H-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	6/6	0/7	1/7	17	2,3
H-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	5/7	3/7	3/7	69	10
anti IL8-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	7/7	0/7	0/7	5	0,5
anti IL8-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	6/6	0/7	0/7	3	0,2
H-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	7/7	1/7	0/7	31	4,4
H-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0,7,14,21, 28 dias	7/7	0/7	0/7	8,3	0,9
anti IL8-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0,7,14,21, 28 dias	7/7	0/7	0/7	6	0,5

anti IL8-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	7/7	0/7	0/7	3	0,1
Trastuzumab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 dias	7/7	0/7	0/7	5	0,4
H-vc-MMAE 8,7 MMAE/Ab	10 mg/kg 1250 µg/m ²	6/6	3/6	0/6	15	1,3
H-vc-MMAE	10 mg/kg 1250 µg/m ² a 0, 7 e 14 dias	7/7	5/7		>19	
H-vc-MMAE	3 mg/kg a 0, 7 e 14 dias	7/7			8	
H-vc-MMAE	1 mg/kg a 0, 7 e 14 dias	7/7			7	
H-vc-MMAF	10 mg/kg	8/8	5/8		>21	
H-vc-MMAF	10 mg/kg a 0, 7 e 14 dias	4/7	4/7	3/7	>21	
H-vc-MMAF	3 mg/kg a 0, 7 e 14 dias	7/7			6	
H-vc-MMAF	1 mg/kg a 0, 7 e 14 dias	8/8			4	
Trastuzumab	10 mg/kg a 0 e 7 dias	8/8			3	
Hg-MC-vc-PAB-MMAF 4,1 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 dias	6/7	3/8	5/8	56	5,1

Fc8-MC-vc-PAB-MMAF 4,4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 dias	7/7	6/8	0/8	25	2,1
7C ₂ -MC-vc-PAB-MMAF 4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 dias	5/6	6/8	1/8	41	3,7
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 dias	3/8	3/8	5/8	62	5,7
2H9-MC-vc-PAB-MMAE		9/9			>14 dias	
2H9-MC-vc-PAB-MMAF		9/9			>14 dias	
11D10-vc-PAB-MMAE		9/9			>14 dias	
11D10-vc-PAB-MMAF		9/9			11 dias	
7C₂ = anticorpo de murino anti-HER2 que se liga a um epítipo diferente de trastuzumab. Fc8 = mutante que não se liga a FcRn Hg = 4D5 humanizado de comprimento total "sem articulação", com cisteínas de cadeia pesada articuladas que sofreram mutação a serinas. Expresso em <i>E. coli</i> (portanto, não glicosilado). 2H9 = Anti-EphB2R 11D10= Anti-0772P						

O termo Ti é o número de animais no grupo de estudo com tumor em T = 0 ÷ total de animais no grupo. O termo PR é o número de animais que obtiveram remissão parcial do tumor ÷ animais com tumor em T = 0 no grupo. O termo CR é o número de animais que obtiveram remissão completa do tumor ÷ animais com tumor em T = 0 no grupo. O termo registo de mortalidade celular é o tempo em dias para o volume do tumor dobrar - o tempo em dias para o volume do tumor de controlo dobrar dividido por 3,32 x tempo para o volume do tumor dobrar nos animais de controlo (dosados com Veículo). O cálculo de registo de mortalidade da célula considera o atraso de crescimento do tumor resultante de tratamento e o tempo para duplicação de volume do tumor do grupo de controlo. Atividade anti-tumoral de ADC é classificada com valores de destruição celular em Log de:

++++	$\geq 3,4$	(altamente ativo)
+++	$= 2,5-3,4$	
++	$= 1,7-2,4$	
+	$= 1,0-1,6$	
inativo	$= 0$	

A Figura 13 mostra a alteração média no volume do tumor durante um período de tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor mamário MMTV-HER2 dosados no Dia 0 com: Veículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) e Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (555 $\mu\text{g}/\text{m}^2$). (H = Trastuzumab). O crescimento de tumores foi retardado pelo tratamento com ADC se comparado com o nível de crescimento do controlo (Veículo). A Figura 14 mostra a alteração média de volume tumoral durante um período de tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor mamário MMTV-HER2 Fo5 dosados no Dia 0 com 10 mg/kg (660 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) de Trastuzumab-MC-MMAE e 1250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE. A Figura 15 mostra a alteração média no volume do tumor durante um período de tempo em ratinhos nus atímicos com aloenxertos de tumor mamário MMTV-HER2 Fo5 dosados com 650 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de Trastuzumab-MC-MMAF. O quadro 2d e Figuras 13-15 mostram que o ADC possui potente atividade anti-tumoral no aloenxerto de um tumor positivo para HER2 (Fo5) que originalmente surgir no ratinho transgénico MMTV-HER2. O anticorpo sozinho (por exemplo, Trastuzumab) não possui atividade anti-tumoral significativa neste modelo (Erickson *et al.* Patente US Nº 6632979). Conforme ilustrado nas Figuras 13-15, o crescimento dos tumores foi retardado pelo tratamento com ADC se comparado com o nível do controlo (Veículo) de crescimento.

Numa descoberta surpreendente e inesperada, os resultados da atividade anti-tumoral *in vivo* do ADC no quadro 2d mostram, de forma geral, que ADC com um número médio baixo de frações de fármaco por anticorpo mostrou eficácia, por exemplo, tempo de duplicação do tumor > 15

dias e registo médio de mortalidade celular $> 1,0$. A Figura 16 mostra que para o conjugado de anticorpo-fármaco, trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, o volume médio do tumor diminuiu e não progrediu onde a proporção de MMAF:trastuzumab era de 2 e 4, enquanto o tumor progrediu numa taxa de 5,9 e 6, mas numa taxa mais lenta que no Veículo (tampão). A taxa de progressão do tumor neste modelo de xenoenxerto de ratinho foi aproximadamente igual, isto é, 3 dias, para Veículo e trastuzumab. Os resultados sugerem que pelo menos para trastuzumab ADC, a proporção ideal de frações de fármaco por anticorpo pode ser menor que cerca de 8, e pode ser de cerca de 2 a cerca de 4.

4.5.5 TOXIDADE EM ROEDOR

Conjugados de anticorpo-fármaco e controlo menos ADC, "Veículo", foram avaliados num modelo de rato para toxicidade aguda. A toxicidade de ADC foi investigada por tratamento de ratos Sprague-Dawley macho e fêmea com o ADC e inspeção subsequente e análise dos efeitos em vários órgãos. Observações gerais incluíram alterações nos pesos corporais e sinais de lesões e sangramento. Parâmetros de patologia clínica (soro, química e hematologia), histopatologia, e necropsia foram conduzidos nos animais dosados.

Considera-se que a perda de peso, ou alteração no peso relativa a animais dosados apenas com Veículo, em animais após dosagem com ADC é um indicador bruto e geral de toxicidade sistémica ou localizada. As Figuras 17-19 mostram os efeitos de vários ADC e controlo (Veículo) após dosagem no peso corporal de ratos.

A hepatotoxicidade foi medida por enzimas hepáticas elevadas, números aumentados de figuras mitóticas e apoptóticas e necrose de hepatócitos. A toxicidade hematolinfoide foi observada pela depleção de leucócitos, primariamente granulócitos (neutrófilos) e/ou plaquetas, e envolvimento de órgão linfoide, isto é, atrofia ou

atividade apoptótica. A toxicidade foi também observada por lesões no trato gastrointestinal tais como números aumentados de figuras mitóticas e apoptóticas e enterocolite degenerativa.

Enzimas indicativas de danos hepáticos que foram estudadas incluem:

AST (aspartato aminotransferase)

- Localização: citoplasmática; fígado, coração, musculoesquelética, rins
- Fígado: proporção plasmática 7000:1
- T½: 17 horas

ALT (alanina aminotransferase)

- Localização: citoplasmática; fígado, rins, coração, musculoesquelética
- Fígado: proporção plasmática 3000:1
- T½: 42 horas, variação diurna

GGT (g-glutamyl transferase)

- Localização: membrana plasmática de células com alta capacidade secretória ou de absorção; fígado, rim, intestino
- Prognóstico inadequado para danos hepáticos; comumente elevado em distúrbios do duto biliar.

Os perfis de toxicidade de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF e trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF foram estudados em ratos Sprague-Dawley fêmeas (Exemplo 19). O anticorpo trastuzumab humanizado não se liga de forma apreciável a tecido de rato, e qualquer toxicidade seria considerada não específica. Variantes nos níveis da dose de 840 e 2105 ug/m² de MMAF foram comparados com trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF a 2105 ug/m².

Os animais nos grupos 1, 2, 3, 4, 6 e 7 (Veículo, 9,94 & 24,90 mg/kg de Trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, 10,69 mg/kg de trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, e 10,17 & 25,50 mg/kg de trastuzumab-MC-MMAF, respetivamente) ganharam peso

durante o estudo. Os animais nos grupos 5 e 8 (26,78 mg/kg de trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF e 21,85 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, respectivamente) perderam peso durante o estudo. No Dia 5 do Estudo, a alteração nos pesos corporais de animais nos grupos 2, 6 e 7 não foi significativamente diferente dos animais do grupo 1. A alteração nos pesos corporais de animais nos grupos 3, 4, 5 e 8 foi estatisticamente diferente dos animais do grupo 1 (Exemplo 19).

Ratos tratados com trastuzumab-MC-MMAF (grupos 6 e 7) não foram distinguíveis dos animais de controlo tratados com veículo em ambos os níveis de dosagem; isto é, este conjugado mostrou um perfil de segurança superior neste modelo. Os ratos tratados com trastuzumab-MC-val-cit-MMAF (sem a fração PAB auto-sacrificial; grupos 2 e 3) mostraram alterações dependentes da dosagem típica para conjugados MMAF; a extensão das alterações foi menor se comparada com um conjugado de comprimento total MC-val-cit-PAB-MMAF (grupo 8). As contagens de plaquetas no dia 5 estavam a cerca de 30 % dos valores basais em animais do grupo 3 (alta dose de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF) comparado com 15 % nos animais do grupo 8 (alta dose de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF). A elevação das enzimas hepáticas AST e ALT, de bilirrubina e a extensão de trombocitopenia foi mais evidente em animais tratados com trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF (grupos 4 e 5) de uma maneira dependente da dose; animais do grupo 5 (grupo de alta dosagem) mostrou, no dia 5, níveis de ALT de cerca de 10x o valor basal e as plaquetas estavam reduzidas em cerca de 90 % no momento da necropsia.

Ratos Sprague-Dawley fêmeas foram também dosados com altos níveis (Exemplo 19, Estudo de Alta Dosagem: Grupos 2, 3, 4) com trastuzumab-MC-MMAF, e Veículo de controlo (Grupo 1). Sinais leves de toxicidade foram observados, incluindo uma elevação dependente da dosagem das enzimas hepáticas

ALT, AST e GGT. No dia 5 os animais no grupo de dosagem mais elevada mostraram uma elevação de 2 vezes na ALT e uma elevação de 5 vezes na AST; GGT também está elevada (6U/L). Os níveis enzimáticos mostraram uma tendência para normalização no dia 12. Havia uma granulocitose em todos os três grupos de dosagem no dia 5, a contagem de plaquetas permaneceu essencialmente inalterada em todos os animais. Alterações morfológicas eram leves; os animais tratados no nível de dose de 4210 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (Grupo 2) mostram histologia não relevante do fígado, baço, timo, intestinos e medula óssea. Atividade apoptótica e mitótica levemente aumentada foi observada no timo e fígado, respectivamente nos animais tratados no nível de dose de 5500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (Grupo 3). A medula óssea estava normocelular, mas mostrava evidência de hiperplasia granulocítica, que é consistente com a granulocitose absoluta observada nas contagens sanguíneas periféricas nestes animais. Animais na dose mais elevada no grupo 4 mostram qualitativamente as mesmas características; a atividade mitótica no fígado parece um pouco aumentada se comparada com animais no Grupo 3. Também, hematopoiese foi observada no baço e fígado.

EphB2R é um tipo de recetor de tirosina cinase 1 TM com homologia próxima entre ratinho e ser humano, e é sobre-expressa em células cancerígenas colorretal. 2H9 é um anticorpo contra EphB2R. O anticorpo nu não possui efeito no crescimento do tumor, mas 2H9-val-cit-MMAE mataram células que expressam EphB2R e mostraram eficácia num modelo de xenoenxerto usando tumores de cólon humano CFX1103 (Mao et al. (2004) Cancer Res. 64:781-788). 2H9 e 7C₂ são ambos anticorpos de ratinho IgG1 anti-HER2. Os perfis de toxicidade de 2H9-MC-val-cit-PAB-MMAF (3,7 MMAF/Ab), 7C₂-MC-val-cit-PAB-MMAF (4 MMAF/Ab), e trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF (5,9 MMAF/Ab) foram comparados. As diferenças na estrutura de cada imunoconjugado ou fração de fármaco do imunoconjugado podem

afetar a farmacocinética e em último caso, o perfil de segurança. O anticorpo trastuzumab humanizado não se liga de forma apreciável a tecido de rato, e qualquer toxicidade seria considerada não específica.

TOXIDADE/SEGURANÇA EM MACACO CYNOMOLGUS

Semelhante ao estudo de toxicidade/segurança com ratos, macacos cynomolgus foram tratadas com ADC seguido por medições de enzima hepática e inspeção e análise dos efeitos em vários órgãos. Observações gerais incluíram alterações nos pesos corporais e sinais de lesões e sangramento. Parâmetros de patologia clínica (química sérica e hematologia), histopatologia, e necropsia foram conduzidos em animais dosados (Exemplo 19).

O conjugado de anticorpo-fármaco, H-MC-vc-PAB-MAAE (H = trastuzumab ligado através de cisteína) não mostraram evidência de toxicidade hepática em qualquer nível de dosagem testado. Granulócitos sanguíneos periféricos mostraram depleção após uma dose única de 1100 mg/m² com recuperação completa 14 dias após a dose. O conjugado de anticorpo- fármaco H-MC-vc-PAB-MMAF mostrou elevação de enzimas hepáticas no nível de dosagem de 550 (transiente) e 880 mg/m², nenhuma evidência de granulocitopenia, e um declínio transiente, dependente da dose (grupos 2 & 3) de plaquetas.

4.6 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Os Compostos Exemplares e Conjugados Exemplares podem ser feitos usando os procedimentos sintéticos descritos a seguir nos Esquemas 5-16. Conforme descrito em maior pormenor a seguir, os Compostos Exemplares ou Conjugados Exemplares podem ser convenientemente preparados usando um Ligante que tem um local reativo para ligação ao Fármaco e Ligando. Num exemplo, um Ligante tem um local reativo que tem um grupo eletrofílico que é reativo a um grupo nucleofílico presente num Ligando, tal como, mas não limitado a um anticorpo. Grupos nucleofílicos úteis num

anticorpo incluem, mas não se limitam a grupos sulfidrilo, hidroxilo e amino. O heteroátomo do grupo nucleofílico de um anticorpo é reativo a um grupo eletrofílico de um Ligante e forma uma ligação covalente com uma unidade de Ligante. Grupos eletrofílicos úteis incluem, mas não se limitam a grupos maleimida e haloacetamida. O grupo eletrofílico proporciona um local conveniente para união do anticorpo.

Num outro exemplo, um Ligante possui um local reativo que tem um grupo nucleofílico que é reativo a um grupo eletrofílico presente num anticorpo. Grupos eletrofílicos úteis num anticorpo incluem, mas não se limitam a grupos aldeído e cetona carbonilo. O heteroátomo de um grupo nucleofílico de um Ligante pode reagir com um grupo eletrofílico num anticorpo e formar uma ligação covalente para uma unidade de anticorpo. Grupos nucleofílicos úteis num Ligante incluem, mas não se limitam a hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiossemicarbazona, hidrazina carboxilato, e arilidrazida. O grupo eletrofílico num anticorpo proporciona um local conveniente para união a um Ligante.

Grupos funcionais de ácido carboxílico e grupos funcionais de cloroformato são também locais reativos úteis para um Ligante porque podem reagir com grupos amino secundários de um Fármaco para formar uma ligação de amida. Também útil como um local reativo é um grupo funcional carbonato num Ligante, tal como, mas não limitado a carbonato de p-nitrofenilo, que pode reagir com um grupo amino de um Fármaco, tal como, mas não limitado a N-metil valina, para formar uma ligação de carbamato. Tipicamente, Fármacos à base de péptido podem ser preparados pela formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos de péptido. Estas ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese de fase líquida (veja-se E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, páginas 76-136, 1965,

Academic Press) que é bem conhecido no campo da química de péptido.

A síntese de um Estirador que tem um grupo maleimida eletrofílico é ilustrada a seguir nos Esquemas 8-9. Métodos sintéticos gerais úteis para a síntese de um Ligante são descritos no Esquema 10. O Esquema 11 mostra a construção de uma unidade de Ligante que tem um grupo val-cit, um grupo maleimida eletrofílico e um grupo Espaçador auto-sacrificial. O esquema 12 ilustra a síntese de um Ligante que tem o grupo phe-lys, um grupo maleimida eletrofílico, com e sem o grupo Espaçador auto-sacrificial PAB. O Esquema 13 apresenta uma descrição geral para a síntese de um Composto de Fármaco-Ligante, enquanto o Esquema 14 apresenta uma via alternativo para preparar um Composto de Fármaco-Ligante. O Esquema 15 ilustra a síntese de um ligante ramificado que contém um grupo BHMS. O Esquema 16 descreve a união de um anticorpo a um Composto de Fármaco-Ligante para formar um Conjugado de Fármaco-Ligante-Anticorpo, e o Esquema 14 ilustra a síntese de conjugados Fármaco-Ligante-Anticorpo que tem, por exemplo, mas não limitado a 2 ou 4 fármacos por Anticorpo.

Conforme descrito em maior pormenor a seguir, os Conjugados Exemplares são convenientemente preparados usando um Ligante que tem dois ou mais Locais Reativos para ligação ao Fármaco e um Ligando. Num exemplo, um Ligante tem um local Reativo que possui um grupo eletrofílico que é reativo a um grupo nucleofílico presente num Ligando, tal como um anticorpo. Grupos nucleofílicos úteis num anticorpo incluem, mas não se limitam a grupos sulfidrilo, hidroxilo e amino. O heteroátomo do grupo nucleofílico de um anticorpo é reativo a um grupo eletrofílico num Ligante e forma uma ligação covalente com uma unidade de Ligante. Grupos eletrofílicos úteis incluem, mas não se limitam a grupos maleimida e haloacetamida. O grupo eletrofílico proporciona um local conveniente para união do anticorpo.

Num outro exemplo, um Ligante tem um local Reativo que tem um grupo nucleofílico que é reativo a um grupo eletrofílico presente num Ligando, tal como um anticorpo. Grupos eletrofílicos úteis num anticorpo incluem, mas não se limitam a grupos aldeído e cetona carbonilo. O heteroátomo de um grupo nucleofílico de um Ligante pode reagir com um grupo eletrofílico num anticorpo e formar uma ligação covalente com uma unidade de anticorpo. Grupos nucleofílicos úteis num Ligante incluem, mas não se limitam a hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiossemicarbazona, hidrazida carboxilato, e arilidrazida. O grupo eletrofílico num anticorpo proporciona um local conveniente para união a um Ligante.

4.6.1 SÍNTESE DA FRAÇÃO DE FÁRMACO

Tipicamente, Fármacos baseados em péptidos podem ser preparados pela formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos de péptido. Estas ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese de fase líquida (veja-se e. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química de péptido.

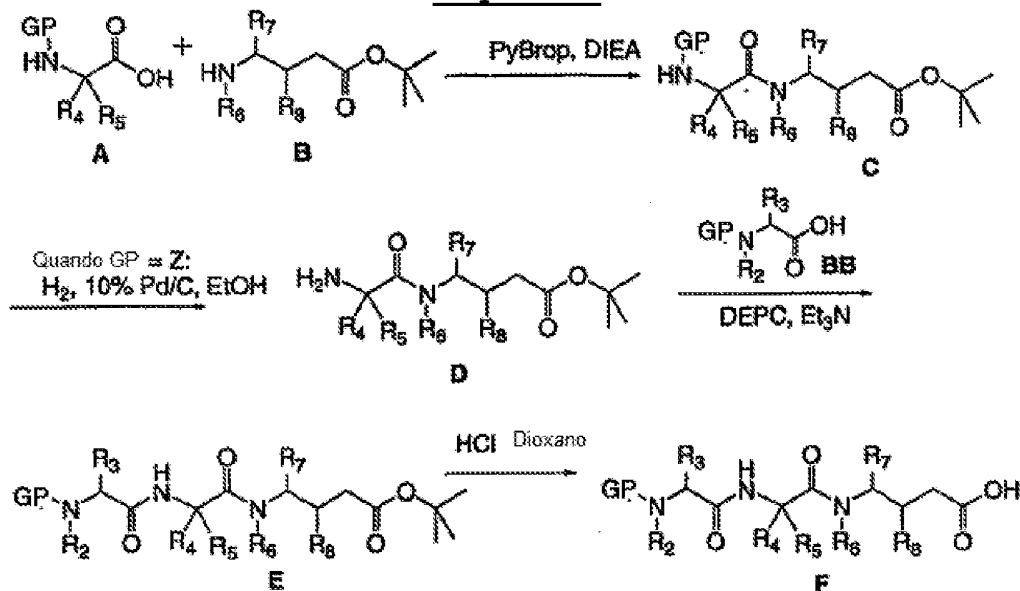
As frações de fármaco auristatina/dolastatina podem ser preparadas de acordo com os métodos gerais de: Patente US N° 5635483; Patente US N° 5780588; Pettit *et al.* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; e Pettit *et al.* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863.

Num exemplo, um Fármaco é preparado pela combinação de um equipamento aproximadamente estequiométrico de um dipéptido e um tripéptido, preferivelmente numa reação de um pote sob condições de condensação adequadas. Esta abordagem é ilustrada nos Esquemas 5-7, a seguir.

O Esquema 5 ilustra a síntese de uma unidade **F** de tripéptido N-terminal que é um intermediário útil para a

síntese dos compostos de fármaco de Fórmula **Ib**.

Esquema 5



Conforme ilustrado no Esquema 5, um aminoácido protegido **A** (onde GP representa um grupo protetor de amina, R^4 é selecionado a partir de hidrogénio, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , $-O-(\text{alquilo } C_1-C_8)$, $-\text{arilo}$, alquil-arilo, alquilo-(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , alquilo-(heterociclo C_3-C_8), onde R^5 é selecionado a partir de H e metilo; ou R^4 e R^5 , conjuntamente, têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n$ onde R^a e R^b são, independentemente, selecionados a partir de hidrogénio, alquilo C_1-C_8 e carbociclo C_3-C_8 e n é selecionado a partir de 2, 3, 4, 5 e 6; e forma um anel com o átomo de carbono ao qual eles são unidos) é acoplado a éster t-butílico **B** (onde R^6 é selecionado a partir de $-H$ e alquilo $-C_1-C_8$; e R^7 é selecionado a partir de hidrogénio, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , $-O-(\text{alquilo } C_1-C_8)$, $-\text{arilo}$, alquil-arilo, alquilo-(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , e alquilo-(heterociclo C_3-C_8), sob condições de acoplamento adequadas, por exemplo, na presença de PyBrop e diisopropiletilamina, ou usando DCC (veja-se, por exemplo, Miyazaki, K. et al. Chem. Pharm. Bul. 1995, 43(10), 1706-1718).

Grupos protetores GP adequados, e métodos sintéticos adequados para proteger um grupo amino com um grupo protetor são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Greene, T.W. e Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2^a. Edição, 1991, John Wiley & Sons. Aminoácidos protegidos exemplares **A** são GP-Ile e, especificamente, GP-Val, enquanto outros aminoácidos protegidos adequados incluem sem limitação: GP-cicloexilglicina, GP-cicloexilalanina, ácido GP-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido GP-aminoisobutírico, GP-fenilalanina, GP-fenilglicina, e GP-terc-butilglicina. **Z** é um grupo protetor exemplar. Fmoc é um outro grupo protetor exemplar. Um éster *t*-butílico **B** exemplar é éster *t*-butílico dolaisoleucina.

O dipeptídeo **C** pode ser purificado, por exemplo, usando cromatografia, e subsequentemente desprotegido, por exemplo, usando H₂ e 10 % de Pd-C em etanol quando GP é benziloxicarbonilo, ou usando dietilamina para remoção de um grupo protetor Fmoc. A amina **D** resultante prontamente forma uma ligação peptídica com um aminoácido **BB** (onde **R**¹ é selecionado a partir de -H, alquilo - C₁-C₈, e carbociclo - C₃-C₈; e **R**² é selecionado a partir de -H e alquilo -C₁-C₈; ou **R**¹ e **R**², conjuntamente, têm a fórmula -(CR^aR^b)_n- onde **R**^a e **R**^b são, independentemente, selecionados a partir de -H, alquilo -C₁-C₈ e carbociclo -C₃-C₈ e **n** é selecionado a partir de 2, 3, 4, 5 e 6; e forma um anel com o átomo de nitrogénio ao qual eles são unidos; e **R**³ é selecionado a partir de hidrogénio, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, alquil-arilo, alquilo-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈, e alquilo-(heterociclo C₃-C₈)). *N,N*-Dialquil aminoácidos são aminoácidos exemplares para **BB**, tal como o comercialmente disponível, *N,N*-dimetil valina. Outros *N,N*-dialquil aminoácidos podem ser preparados por bis-alquilação redutiva usando procedimentos conhecidos (veja-se, por exemplo, Bowman, R.E., Stroud,

H.H. J. Chem. Soc., 1950, 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val e Fmoc-Me-L-glicina são dois aminoácidos exemplares **BB** úteis para a síntese de derivados de *N*-monoalquilo. A amina **D** e o aminoácido **BB** reagem para proporcionar o tripéptido **E** usando reagente de acoplamento DEPC com trietilamina como a base. O grupo protetor de terminal C de **E** é subsequentemente desprotegido usando HCl para proporcionar o composto de tripéptido de fórmula **F**.

Metodologia ilustrativa de acoplamento de DEPC e a metodologia de acoplamento de PyBrop mostrada no Esquema 5 são descritas a seguir no Procedimento Geral A e Procedimento Geral B, respectivamente. Metodologia ilustrativa para a desproteção de uma amina protegida Z através de hidrogenação catalítica é descrita a seguir no Procedimento Geral C.

Procedimento Geral A: Síntese de péptido usando DEPC.

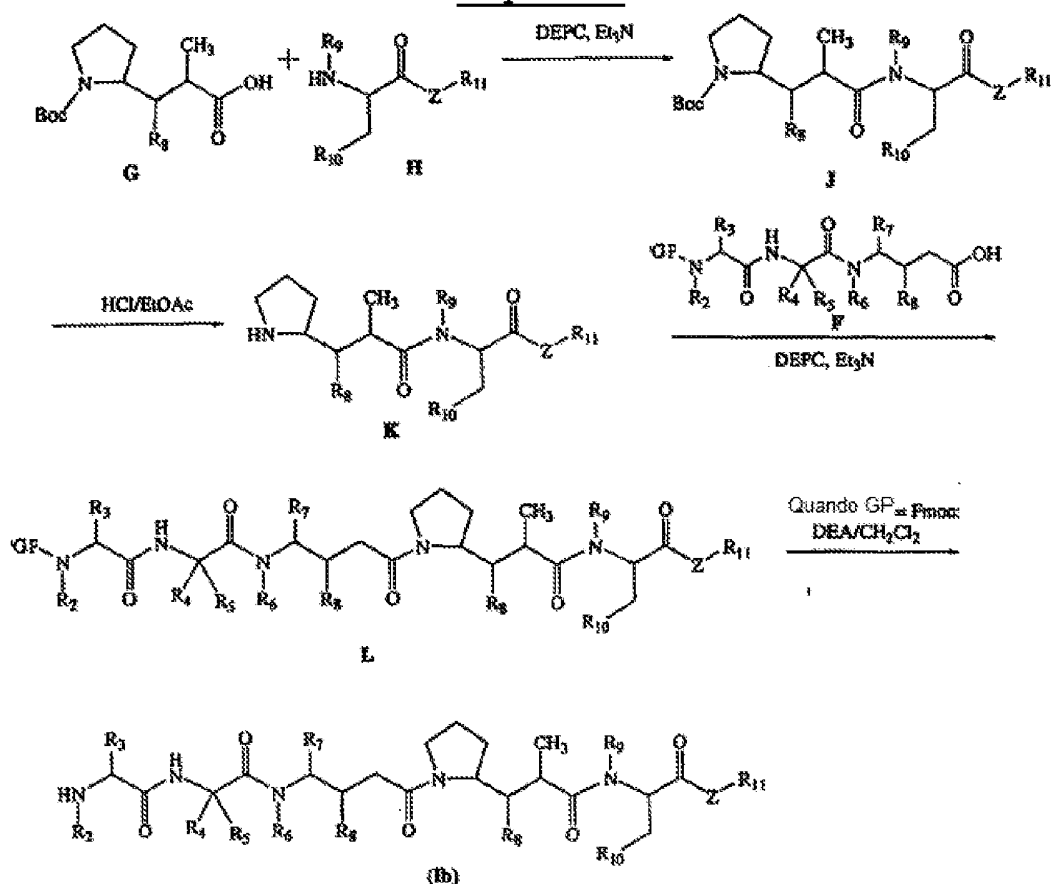
O aminoácido *N*-protegido ou *N*, *N*-bissubstituído ou péptido **D** (1,0 eq.) e uma amina **BB** (1,1 eq.) são diluídos com um solvente orgânico aprótico, tal como diclorometano (0,1 a 0,5 M). Uma base orgânica tal como trietilamina ou diisopropiletilamina (1,5 eq.) é, então, adicionada, seguido por DEPC (1,1 eq.). A solução resultante é agitada, preferivelmente sob argon, durante até 12 horas enquanto é monitorizada por HPLC ou TLC. O solvente é removido a vácuo à temperatura ambiente, e o produto bruto é purificado usando, por exemplo, HPLC ou cromatografia de coluna de fulgor (coluna de sílica gel). Frações relevantes são combinadas e concentradas á vácuo para suportar tripéptido **E** que é seco sob vácuo durante a noite.

Procedimento Geral B: Síntese de péptido usando PyBrop. O aminoácido **B** (1,0 eq.), opcionalmente que tem um grupo protetor carboxilo, é diluído com um solvente orgânico aprótico tal como diclorometano ou DME para proporcionar uma solução com uma concentração entre 0,5 e 1,0 mM, e então é adicionada diisopropiletilamina (1,5

eq.). Aminoácido **A** protegido por Fmoc- ou Z- (1,1 eq.) é adicionado como um sólido numa fração, então é adicionado PyBrop (1,2 eq.) à mistura resultante. A reação é monitorizada por TLC ou HPLC, seguido por um procedimento de preparação semelhante àquele descrito no Procedimento Geral **A**.

Procedimento Geral C: Remoção de Z através de hidrogenação catalítica. Aminoácido protegido por Z ou péptido **C** é diluído com etanol para proporcionar uma solução com uma concentração entre 0,5 e 1,0 mM num recipiente adequado, tal como um balão de fundo redondo de paredes espessas. Adiciona-se 10 % de paládio em carbono (5-10 % p/p) e a mistura de reação é colocada sob atmosfera de hidrogénio. O progresso da reação é monitorizado usando HPLC e está completa, geralmente, dentro de 1-2 horas. A mistura de reação é filtrada através de uma almofada de celite pré-lavada e a celite é novamente lavada com um solvente orgânico polar, tal como metanol após a filtração. A solução de eluente é concentrada a vácuo para suportar um resíduo que seja diluído com um solvente orgânico, preferivelmente tolueno. O solvente orgânico é, então, removido a vácuo para suportar a amina desprotegida **C**.

O esquema 6 mostra um método útil para preparar um dipéptido de terminal **C** de fórmula **K** e um método para acoplamento do dipéptido de fórmula **K** com o tripéptido de fórmula **F** para preparar compostos de fármaco de Fórmula **Ib**.

Esquema 6

O dipéptido **K** pode ser prontamente preparado pela condensação do aminoácido modificado Boc-dolaproína **G** (veja-se, por exemplo, Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725), com uma amina de fórmula **H** usando agentes de condensação bem conhecidos para química de péptido, tal como, por exemplo, DEPC na presença de trietilamina, conforme mostrado no Esquema 5.

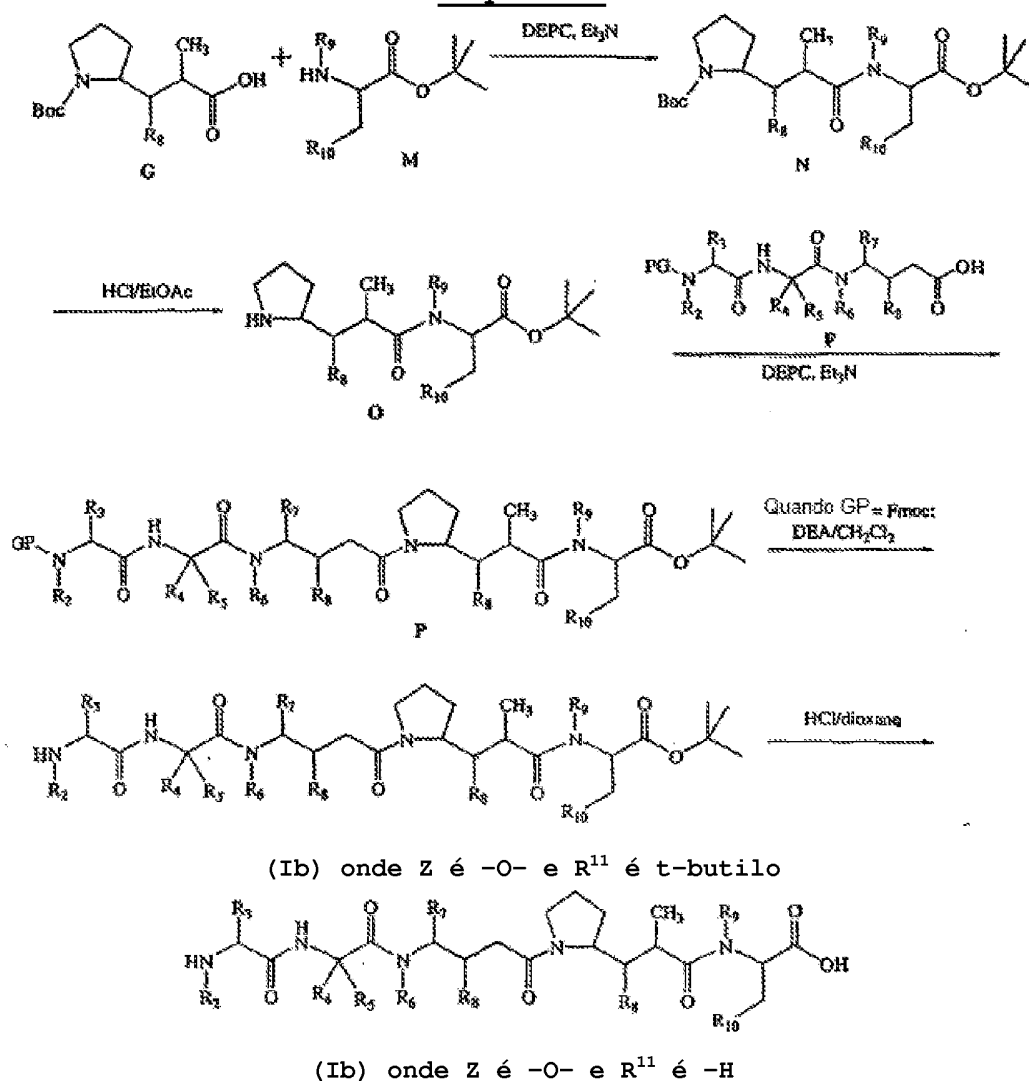
O dipéptido de fórmula **K** pode, então, ser acoplado com um tripéptido de fórmula **F** usando o Procedimento Geral D para preparar os compostos de fármaco protegidos Fmoc de fórmula **L**, que podem ser subsequentemente desprotegidos usando o Procedimento Geral E de modo a proporcionar os compostos de fármaco de fórmula **(Ib)**.

Procedimento Geral D: Síntese de fármaco. Uma mistura

de dipéptido K (1,0 eq.) e tripéptido **F** (1 eq.) é diluída com um solvente orgânico aprótico, tal como diclorometano, para formar uma solução de 0,1 M; então um ácido forte, tal como ácido trifluoroacético (1/2 p/p) é adicionado e a mistura resultante é agitada sob atmosfera de nitrogénio durante duas horas a 0 °C. A reação pode ser monitorizada usando TLC ou, preferivelmente, HPLC. O solvente é removido a vácuo e o resíduo resultante é azeotropicamente seco duas vezes, preferivelmente usando tolueno. O resíduo resultante é seco sob alto vácuo durante 12 horas e então diluído com um solvente orgânico aprótico, tal como diclorometano. Uma base orgânica tal como trietilamina ou diisopropiletilamina (1,5 eq.) é, então, adicionada, seguida tanto por PyBrop (1,2 eq.) quanto por DEPC (1,2 eq.) dependendo da funcionalidade química no resíduo. A mistura de reação é monitorizada tanto por TLC quanto HPLC e ao término, a reação é submetida a um procedimento de preparação semelhante ou idêntico àquele descrito no Procedimento Geral **A**.

Procedimento Geral E: Remoção de Fmoc usando dietilamina. Um Fármaco protegido por Fmoc **L** é diluído com um solvente orgânico aprótico tal como diclorometano e a solução resultante é adicionada dietilamina (1/2 p/p). O progresso da reação é monitorizado por TLC ou HPLC e está tipicamente completa dentro de 2 horas. A mistura de reação é concentrada a vácuo e o resíduo resultante é seco azeotropicamente, preferivelmente usando tolueno, então é seco sob vácuo elevado para suportar o Fármaco **lb** que tem o grupo amino desprotegido.

O Esquema 7 mostra um método útil para preparar derivados de MMAF de Fórmula (Ib).

Esquema 7

O polipéptido **O** pode ser prontamente preparado pela condensação do aminoácido modificado Boc-dolaproína **G** (veja-se, por exemplo, Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725), com uma amina de fórmula **M** usando agentes de condensação bem conhecidos para química de péptido, tal como, por exemplo, DEPC na presença de trietilamina, conforme mostrado nos Esquemas 5 e 6.

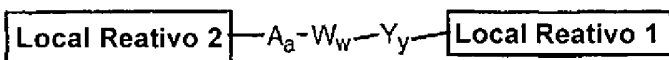
O dipéptido de fórmula **O** pode, então, ser acoplado a um tripéptido de fórmula **F** usando o Procedimento Geral **D** para preparar os compostos MMAF protegidos com Fmoc de

fórmula **P**, que podem ser subsequentemente desprotegidos usando o Procedimento Geral E de modo a proporcionar os compostos de fármaco MMAF de fórmula (**Ib**).

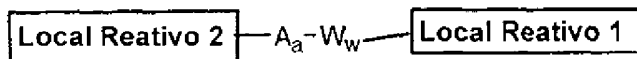
Dessa maneira, os métodos acima são úteis para preparar Fármacos conforme descrito no presente documento.

4.6.2 SÍNTESE DE LIGANTE DE FÁRMACO

Para preparar um Composto de Fármaco-Ligante, o Fármaco é feito reagir com um local reativo no Ligante. No geral, o Ligante pode ter a estrutura:

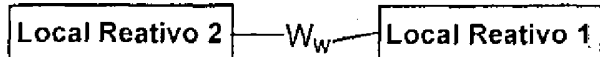


quando uma unidade de Espaçador (-Y-) e uma unidade de Estirador (-A-) estão presentes. Alternativamente, o Ligante pode ter a estrutura:



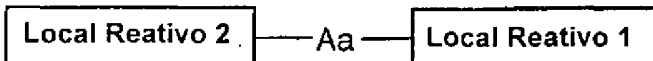
quando a unidade de Espaçador (-Y-) está ausente.

O Ligante pode também ter a estrutura:



quando a unidade de Estirador (-A-) e a unidade de Espaçador (-Y-) estão ausentes.

O Ligante pode ter também a estrutura:

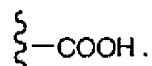


quando a unidade de Aminoácido (W) e a unidade de Espaçador (Y) estão ausentes.

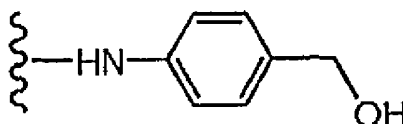
No geral, um Ligante adequado tem uma unidade de Aminoácido ligada a uma unidade de Estirador opcional e uma unidade de Espaçador opcional. O Local Reativo 1 está presente no terminal do Espaçador e o local Reativo 1 está presente no terminal do Estirador. Se uma unidade de Espaçador não estiver presente, então o local Reativo 1 está presente no terminal C da unidade de Aminoácido. Num exemplo da invenção, o Local Reativo N° 1 é reativo a um átomo de nitrogénio do Fármaco, e o Local Reativo N° 2 é

reativo a um grupo sulfidrilo no Ligando. Locais Reativos 1 e 2 podem ser reativos a grupos funcionais diferentes.

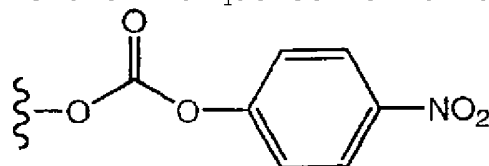
Num exemplo, o Local Reativo N° 1 é



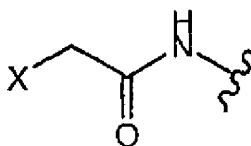
Num outro exemplo, o Local Reativo N° 1 é



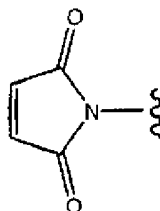
Em ainda um outro exemplo, o Local Reativo N° 1 é um carbonato de p-nitrofenilo que tem a fórmula



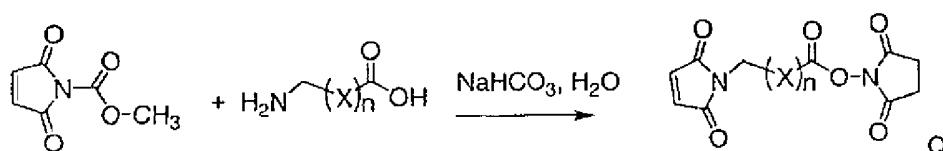
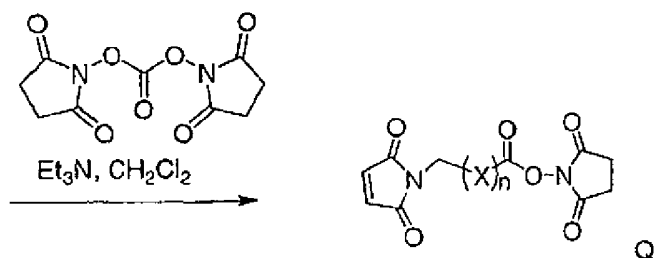
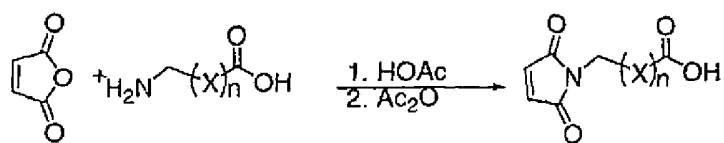
Num exemplo, o Local Reativo N° 2 é um grupo de aceitação de tiol. Grupos de aceitação de tiol adequados incluem grupos haloacetamida que tem a fórmula



em que X representa um grupo abandonante, preferivelmente O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, ou -I, ou um grupo maleimida que tem a fórmula

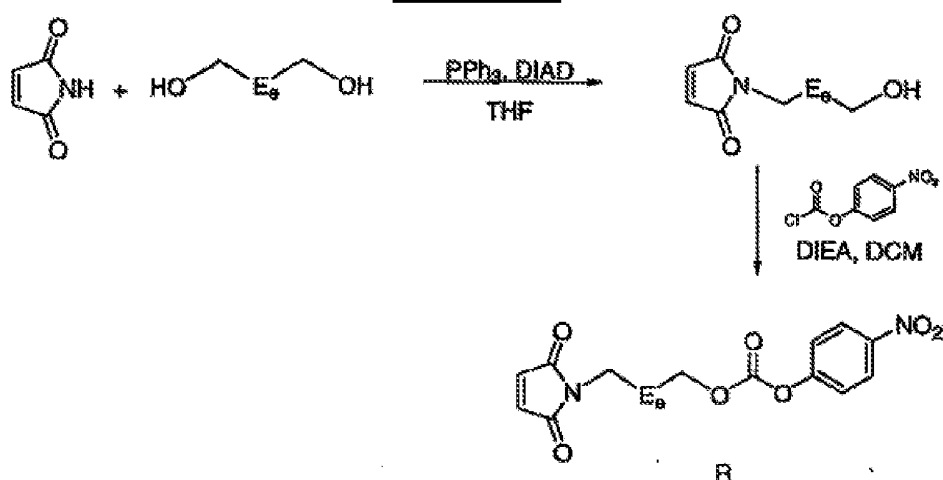


Ligantes úteis podem ser obtidos através de fontes comerciais, tal como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), ou preparados conforme resumido nos Esquemas 8-10 a seguir.

Esquema 8

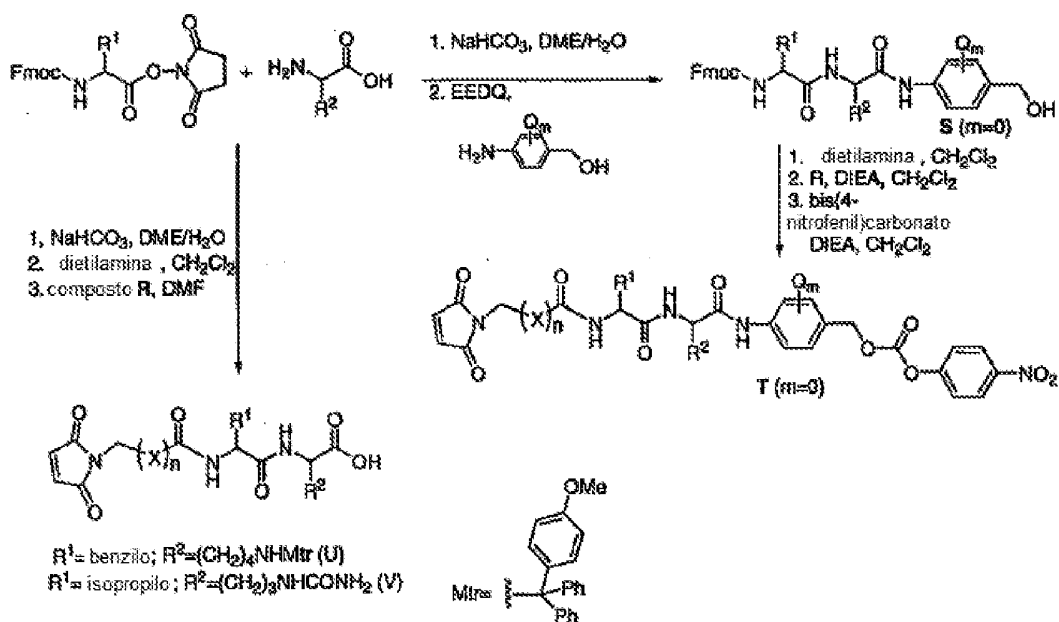
em que X é $-\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$; e n é um número inteiro de 0-10 quando X é $-\text{CH}_2-$; ou 1-10 quando X é $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$

O método mostrado no Esquema 9 combina maleimida com um glicol sob condições de Mitsunobu e faz um Estirador polietilenoglicol maleimida (veja-se, por exemplo, Walker, M.A. J. Org. Chem. 1995, 60, 5352-5), seguido por instalação de um grupo de Local Reativo carbonato de p-nitrofenilo.

Esquema 9

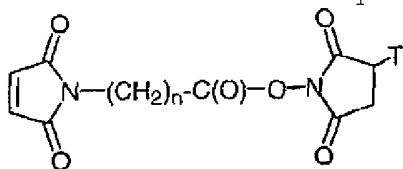
em que E é $-\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$; e n é um número inteiro de 0-8;

Alternativamente, estiradores PEG-maleimida e PEG-haloacetamida podem ser preparados conforme descrito por Frisch, *et al.*, Bioconjugate Chem. 1996, 7, 180-186. O Esquema 10 ilustra uma síntese geral de uma unidade de Ligante ilustrativa contendo um grupo Estirador maleimida e opcionalmente um Espaçador auto-sacrificial p-aminobenzil éter.

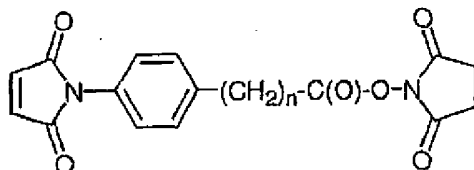
Esquema 10

em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogênio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4, e n é um número inteiro que varia de 0-10.

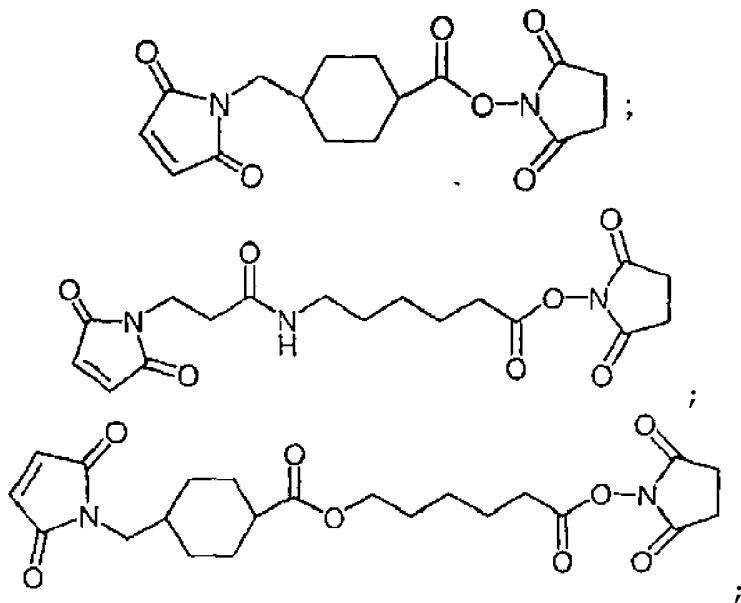
Estiradores úteis podem ser incorporados a um Ligante usando os intermediários comercialmente disponíveis da Molecular Biosciences (Boulder, CO) descritos a seguir, através da utilização de técnicas conhecidas de síntese orgânica. Estiradores de Fórmula (IIIa) podem ser introduzidos num Ligante através da reação dos intermediários a seguir com o terminal N de uma unidade de Aminoácido conforme ilustrados nos Esquemas 11 e 12.



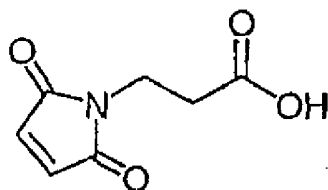
em que n é um número inteiro que varia de 1-10 e T é -H ou -SO₃Na;



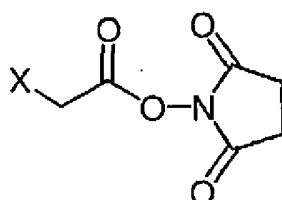
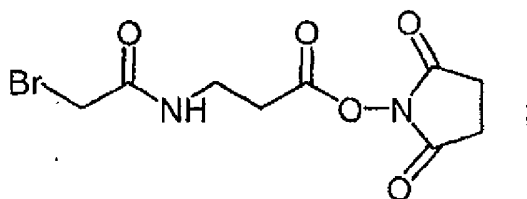
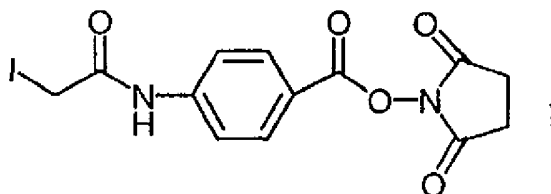
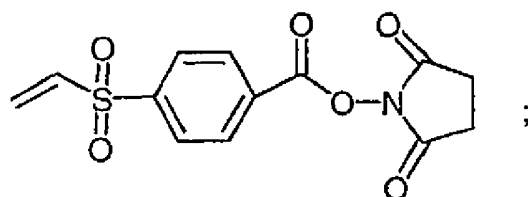
em que n é um número inteiro que varia de 0-3;



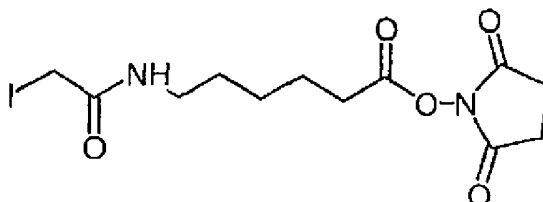
e



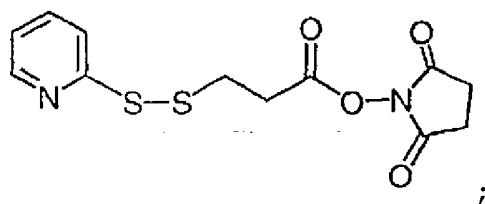
Unidades de Estirador de fórmula (**IIb**) podem ser introduzidas num Ligante pela reação dos intermediários a seguir com o terminal N de uma unidade de Aminoácido:



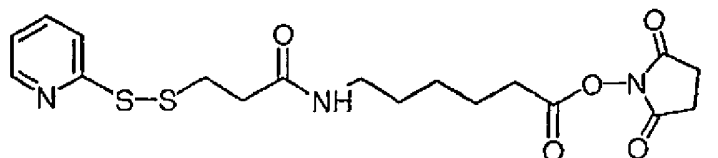
em que X é -Br ou -I; e



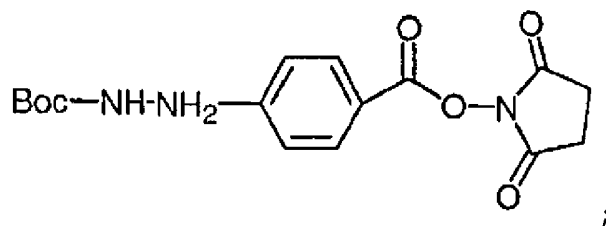
Unidades de Estirador de fórmula (**IV**) podem ser introduzidas num Ligante através da reação dos intermediários a seguir com o terminal N de uma unidade de Aminoácido:



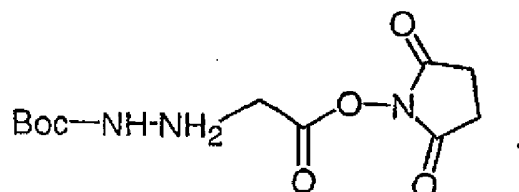
e



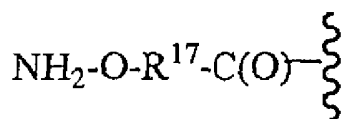
Unidades de Estirador de fórmula (Va) podem ser introduzidas num Ligante através da reação dos intermediários a seguir com o terminal N de uma unidade de Aminoácido:



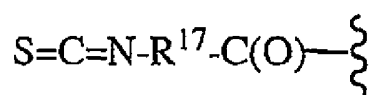
e



Outros Estiradores úteis podem ser sintetizados de acordo com procedimentos conhecidos. Estiradores de Aminoaxi da fórmula mostrada a seguir podem ser preparados através do tratamento de haletos de alquilo com N- Boc-hidroxilamina de acordo com os procedimentos descritos por Jones, D.S. *et al.*, Tetrahedron Letters, 2000, 41(10), 1531-1533; e Gilon, C. *et al.*, Tetrahedron, 1967, 23(11), 4441-4447.



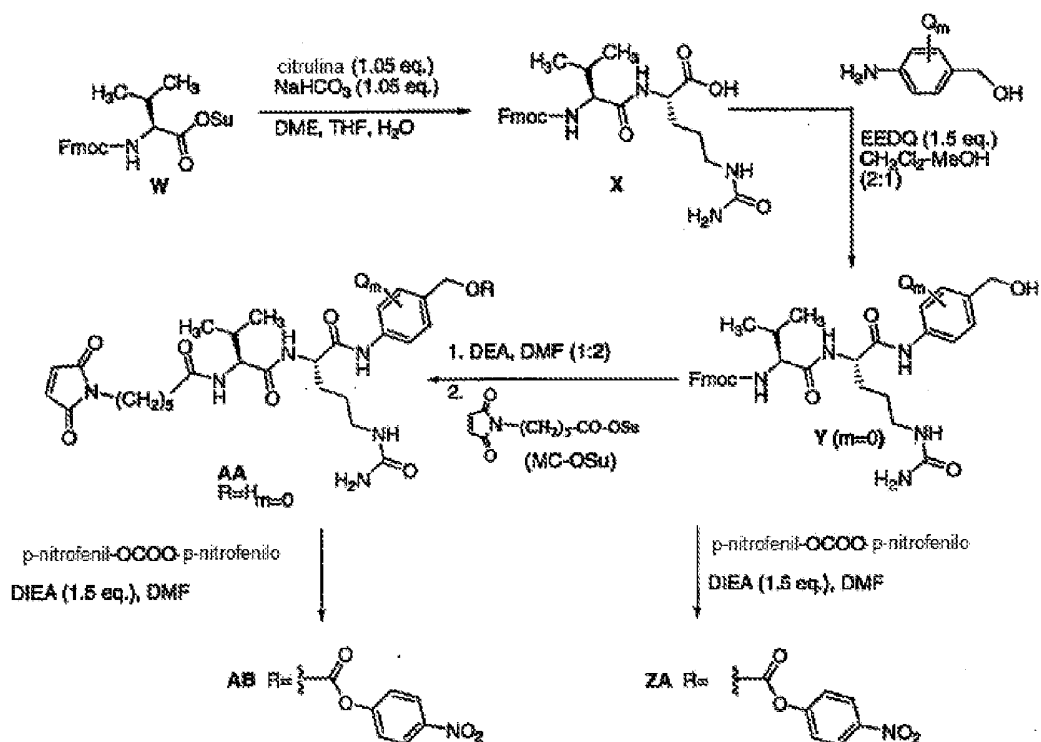
em que R^{17} é selecionado a partir de -alquilenos C_1-C_{10} -, -carbociclo C_3-C_8 -, -O-(alquilo C_1-C_8)-, -arileno-, alquilenos C_1-C_{10} -arileno-, -arileno-alquilenos C_1-C_{10} -, -alquilenos C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquilenos C_1-C_{10} -, -heterociclo C_3-C_8 -, -alquilenos C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquilenos C_1-C_{10} -, $-(CH_2CH_2O)_r-$, e $(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; e r é um inteiro que varia de 1-10; Estiradores de isotiocianato da fórmula mostrada a seguir podem ser preparados de cloretos de ácido isotiocianato carboxílico conforme descrito na Angew. Chem. 1975, 87(14):517.



em que R^{17} é conforme descrito no presente documento.

O Esquema 11 mostra um método para obter um ligante de dipéptido val-cit que tem um Estirador de maleimida e opcionalmente um Espaçador auto-sacrificial p-aminobenzila.

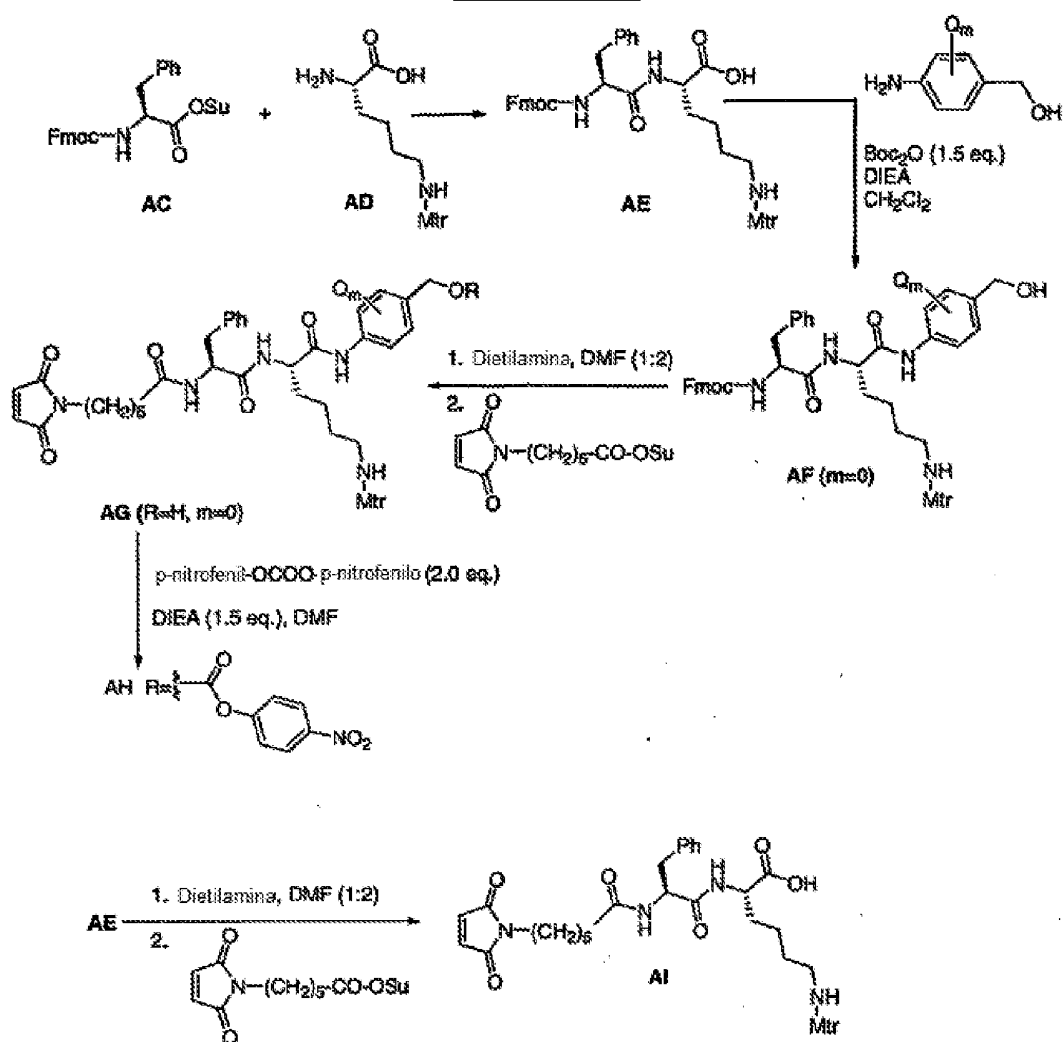
Esquema 11



em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4.

O Esquema 12 ilustra a síntese de uma unidade de Ligante de dipéptido phe-lys(Mtr) que tem uma unidade de Estirador maleimida e uma unidade de Espaçador auto-sacrificial p-aminobenzilo. Material de partida **AD** (lys(Mtr)) está comercialmente disponível (Bachem, Torrance, CA) ou pode ser preparado de acordo com Dubowchik, *et al.* Tetrahedron Letters (1997) 38:5257-60.

Esquema 12

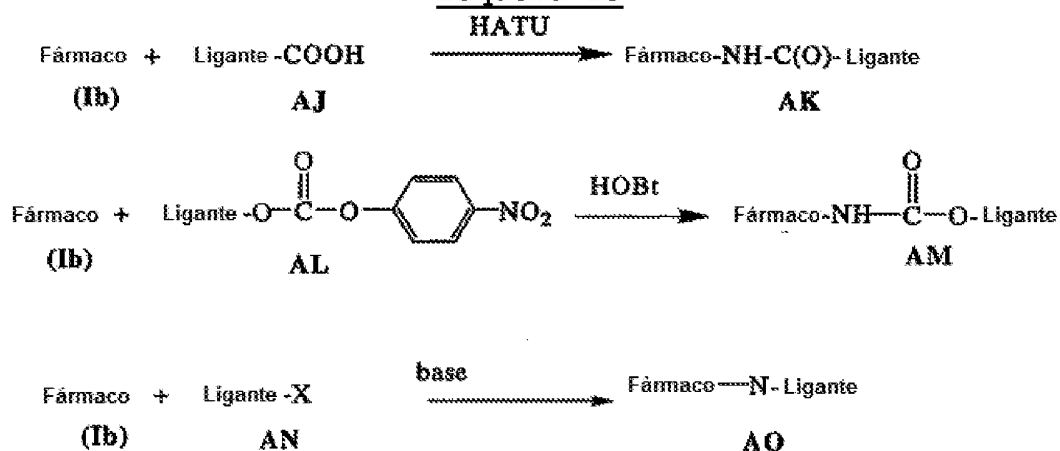


em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4.

Conforme mostrado no Esquema 13, um Ligante pode ser feito reagir com um grupo amino de um Composto de Fármaco de Fórmula (Ib) para formar um Composto de Fármaco-Ligante que contém um grupo amida ou carbamato, ligando a unidade de Fármaco com a unidade de Ligante. Quando o Local de Reação N° 1 é um grupo ácido carboxílico, como no Ligante **AJ**, a reação de acoplamento pode ser executada usando HATU ou PyBrop e uma base de amina apropriada, resultando num Composto de Fármaco-Ligante **AK**, contendo uma ligação de amida entre a unidade de Fármaco e a unidade de Ligante. Quando o Local de Reação N° 1 for um carbonato, como no Ligante **AL**, o Ligante pode ser acoplado ao Fármaco usando HOBt numa mistura de DMF/piridina para proporcionar um Composto de Fármaco-Ligante **AM**, contendo uma ligação carbamato entre a unidade de Fármaco e a unidade de Ligante.

Alternativamente, quando o Local Reativo N- 1 for um bom grupo abandonante, tal como no Ligante **AN**, o Ligante pode ser acoplado com um grupo amina de um Fármaco através de um processo de substituição nucleofílico para proporcionar um Composto de Fármaco-Ligante que tem uma ligação de amina (**AO**) entre a unidade de Fármaco e a unidade de Ligante.

Métodos ilustrativos úteis para ligação de um Fármaco a um Ligando para formar um Composto de Fármaco-Ligante são ilustrados no Esquema 13 e são descritos nos Procedimentos Gerais G-H.

Esquema 13**Procedimento Geral G: Formação de amida usando HATU.**

Um **Fármaco (Ib)** (1,0 eq.) e um **Ligante N**-protegido contendo um local Reativo de ácido carboxílico (1,0 eq.) são diluídos com um solvente orgânico adequado, tal como diclorometano, e a solução resultante é tratada com HATU (1,5 eq.) e uma base orgânica, preferivelmente piridina (1,5 eq.). A mistura de reação é deixada agitar sob uma atmosfera inerte, preferivelmente árgon, durante 6 horas, em cujo período de tempo a mistura de reação é monitorizada usando HPLC. A mistura de reação é concentrada e o resíduo resultante é purificado usando HPLC para resultar na amida de fórmula **AK**.

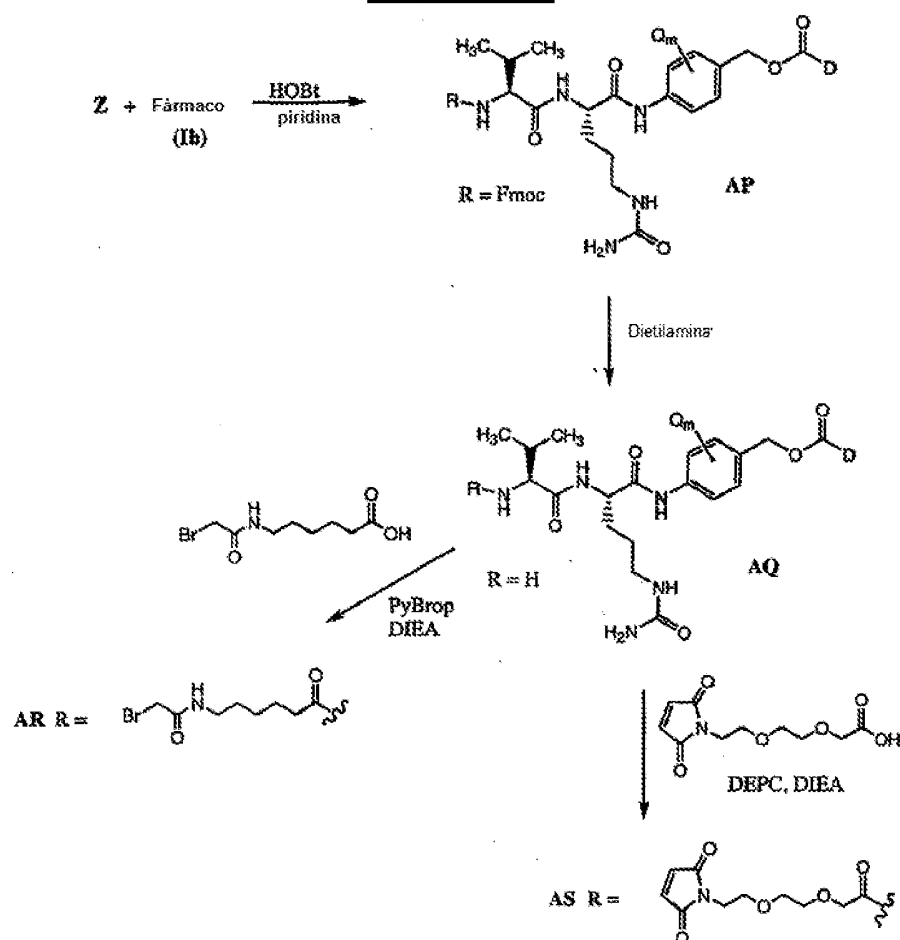
Procedimento H: Formação de carbamato usando HOBt.

Uma mistura de um **Ligante AL** que tem um local Reativo carbonato de p-nitrofenilo (1,1 eq.) e **Fármaco (Ib)** (1,0 eq.) é diluída com um solvente orgânico aprótico, tal como DMF, para proporcionar uma solução que tem uma concentração de 50-100 nM, e a solução resultante é tratada com HOBt (2,0 eq.) e colocada em atmosfera inerte, preferivelmente árgon. A mistura de reação é deixada agitar durante 15 minutos, então uma base orgânica, tal como piridina (1/4 v/v) é adicionada e o progresso da reação é monitorizado usando HPLC. O **Ligante** é tipicamente consumido dentro de 16 horas. A mistura de reação é, então, concentrada no vácuo e o

resíduo resultante é purificado usando, por exemplo, HPLC para resultar no carbamato **AM**.

Um método alternativo para preparar Compostos Fármaco-Ligante é descrito no Esquema 14. Usando o método do Esquema 14, o fármaco é unido a uma unidade Ligante parcial (por exemplo, **ZA**), que não possui uma unidade de Estirador unida. Isto proporciona o intermediário **AP**, que tem uma unidade de Aminoácido que tem terminal N protegido com Fmoc. O grupo Fmoc é, então, removido e o intermediário de Amina **AQ** resultante é, então, unido a uma unidade de Estirador através de uma reação de acoplamento catalisada usando PyBrop ou DEPC. A construção de Compostos Fármaco-Ligante contendo um Estirador de bromoacetamida **AR** ou um Estirador de maleimida PEG **AS** é ilustrado no Esquema 14.

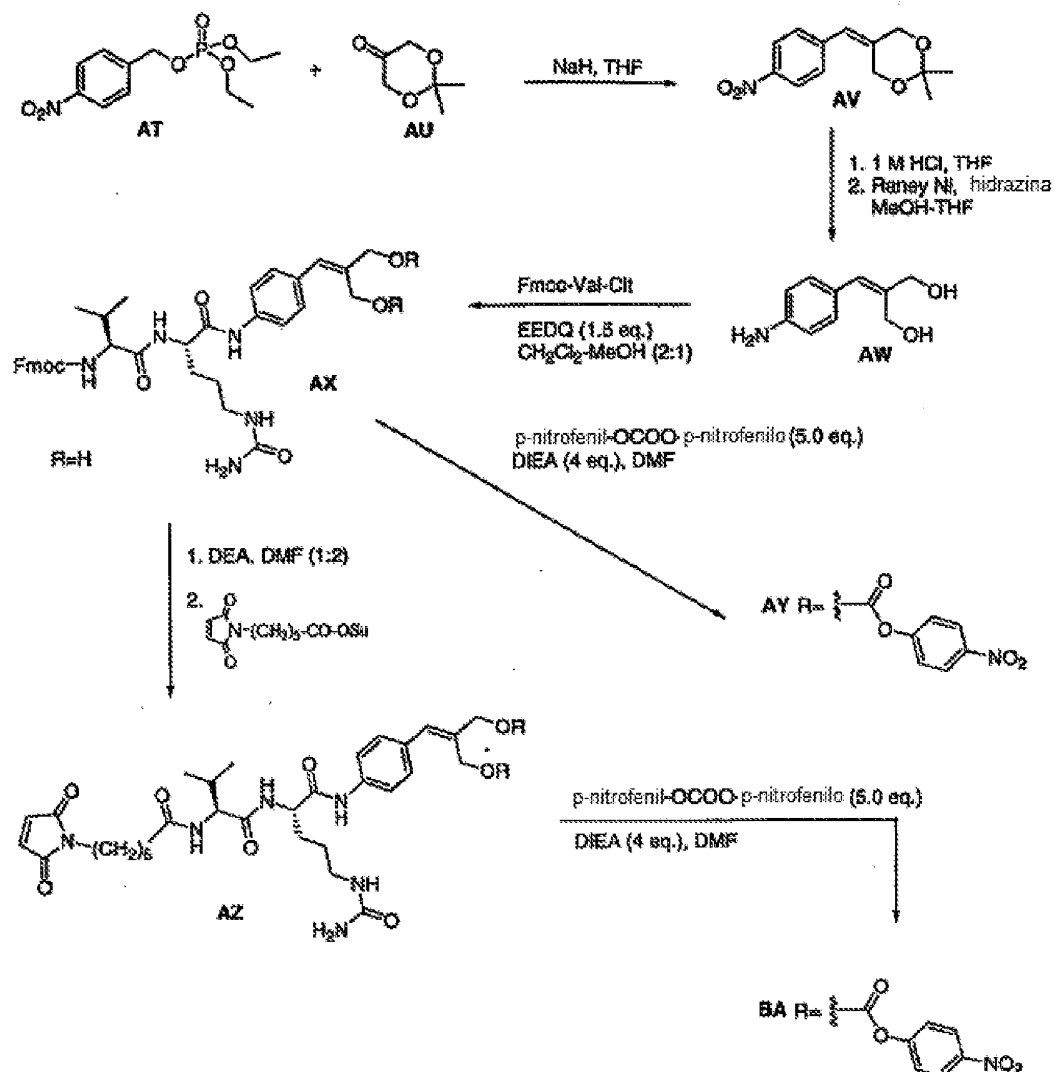
Esquema 14



em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogénio, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4.

A metodologia útil para a preparação de uma unidade de Ligante contendo um espaçador ramificado é mostrada no Esquema 15.

Esquema 15



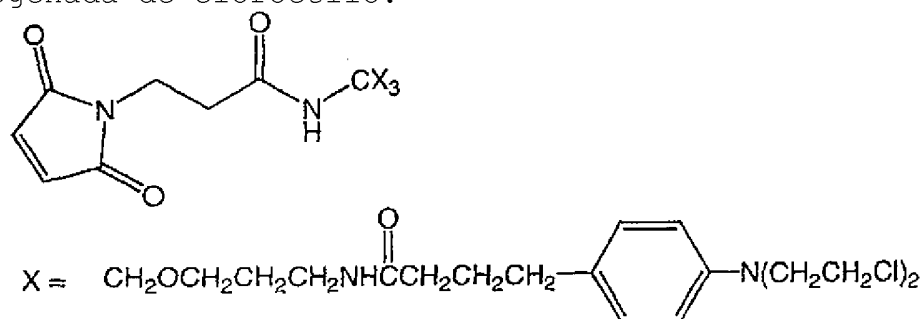
O Esquema 15 ilustra a síntese de um ligante dipéptido val-cit que tem uma unidade de Estirador de maleimida e uma unidade bis(4-hidroxímetil)estireno (BHMS). A síntese do intermediário BHMS (**AW**) foi melhorada em relação a procedimento anteriores da literatura (veja-se Publicação

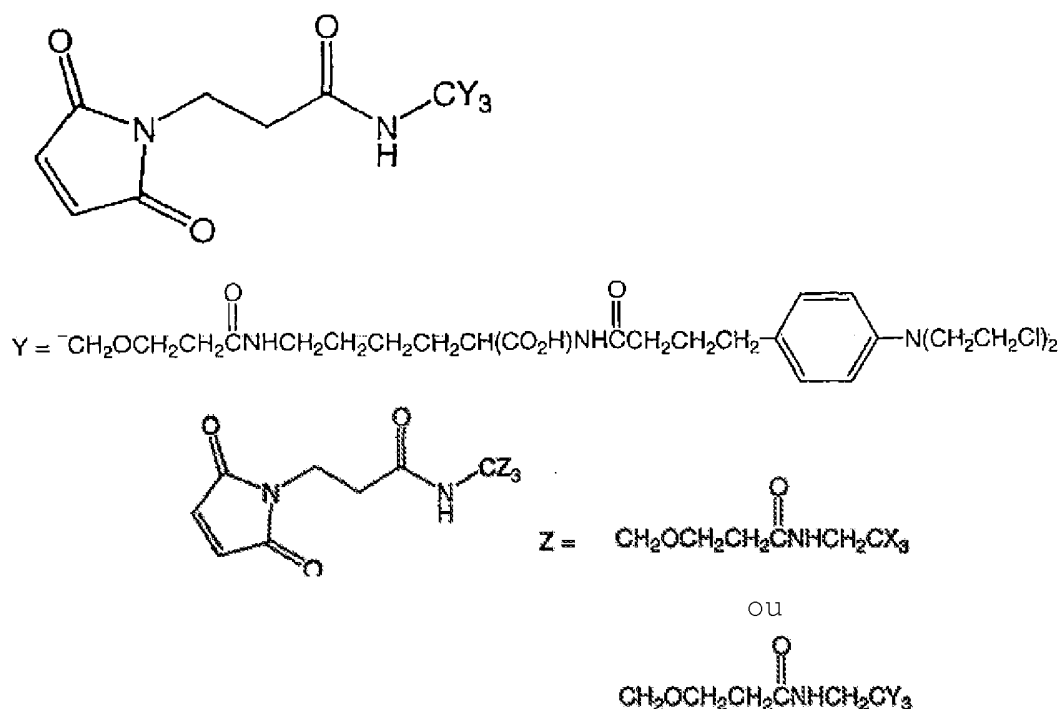
Internacional N° WO 9813059 de Firestone et al., e Crozet, M.P.; Archambault, G.; Vanelle, P., Nouguier, R. Tetrahedron Lett. (1985) 26:5133-5134) e utiliza como materiais de partida dietil(4-nitrobenzil)fosfonato (**AT**), comercialmente disponível, e 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (**AU**), comercialmente disponível. Ligantes **AY** e **BA** podem ser preparados do intermediário **AW** usando a metodologia descrita no Esquema 9.

4.6.3 LIGANTES DENDRÍTICOS

O ligante pode ser um ligante do tipo dendrítico para união covalente de mais de uma fração de fármaco através de uma fração ligante de ramificação, multifuncional a um Ligando, tal como, mas não limitada a um anticorpo (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Ligantes dendríticos podem aumentar a proporção molar de fármaco para anticorpo, isto é, a carga, que está relacionada com a potência do Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando. Dessa maneira, onde um anticorpo engenheirado de cisteína suporta apenas um grupo cisteína tiol reativo, uma variedade de frações de fármaco pode ser unida através de um ligante dendrítico.

As formas de realização exemplares a seguir de reagentes de ligante dendrítico permitem que até nove reagentes de fração de fármaco nucleofílicos sejam conjugados pela reação com os grupos funcionais mostarda nitrogenada de cloroetilo:

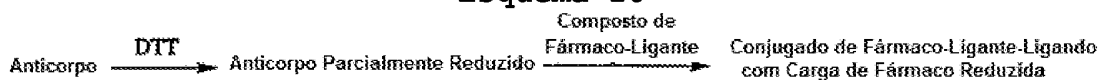




4.6.4 CONJUGAÇÃO DE FRAÇÕES DE FÁRMACO A ANTICORPOS

O Esquema 16 ilustra uma metodologia útil para preparar conjugados Fármaco-Ligante-Ligando que tem cerca de 2 a cerca de 4 fármacos por anticorpo. Um anticorpo é tratado com um agente de redução, tal como ditiotreititol (DTT) para reduzir alguns ou todos os resíduos de bissulfeto de cisteína para formar grupos cisteína tiol altamente nucleofílicos ($-\text{CH}_2\text{SH}$). O anticorpo parcialmente reduzido reage, dessa maneira, com compostos fármaco-ligante, ou reagentes de ligante, com grupos funcionais eletrofílicos tais como maleimida ou α -halo carbonilo, de acordo com o método de conjugação na página 766 de Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

Esquema 16



Por exemplo, um anticorpo, isto é, AC10, dissolvido em 500 mM de borato de sódio e 500 mM de cloreto de sódio com pH 8,0 é tratado com um excesso de 100 mM de ditiotreititol

(DTT). Após incubação a 37 °C durante cerca de 30 minutos, o tampão é trocado por eluição com resina Sephadex G25 e eluída com PBS com 1 mM DTPA. O valor tiol/Ab é verificado por determinação da concentração do anticorpo reduzido da absorvância de 280 nm da solução e a concentração de tiol pela reação com DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) e determinação da absorvância 412 nm. O anticorpo reduzido dissolvido em PBS é arrefecido em gelo. O ligante de fármaco, por exemplo, MC-val-cit-PAB-MMAE em DMSO, dissolvido em acetonitrilo e água na concentração conhecida é adicionado ao anticorpo reduzido arrefecido em PBS. Após cerca de 1 hora, maleimida em excesso é adicionada para resfriar rapidamente a reação e capear quaisquer grupos tióis de anticorpo não reagidos. A mistura de reação é concentrada por ultrafiltração centrífuga e o ADC, por exemplo, AC10-MC-vc-PAB-MMAE, é purificado e dessalinizado por eluição através de resina G25 em PBS, filtrado através de filtros de 0,2 µm sob condições estéreis, e congelado para armazenagem.

Uma variedade de conjugados de anticorpo fármaco (ADC) foi preparada, com uma variedade de ligantes, e as frações de fármaco MMAE e MMAF. O quadro a seguir é um grupo exemplar de ADC que foi preparado seguindo o protocolo do Exemplo 27, e caracterizado por HPLC e ensaio de carga de fármaco.

Alvo (antigénio)	ADC	Quantidade Isolada (mg)	Proporção de Fármaco/Ab
0772P	16E12-MC-vc-PAB-MMAE	1,75	4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAE	46,8	4,4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAF	54,5	3,8
Brevican	Brevican-MC-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-PAB-MMAF	1,4	6
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAE	38,1	4,3

EP2489364B1

CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAF	43	4, 1
CRIPTO	11F4-MC-vc-PAB-MMAF	6	4, 8
CRIPTO	25G8-MC-vc-PAB-MMAF	7, 4	4, 7
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	2, 3	4, 6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	2, 9	4, 6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	1, 4	3, 8
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	5, 1	4
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	3	4, 6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	4, 8	4, 1
E16	385-MC-vc-PAB-MMAF	24, 7	4, 4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	29, 9	7, 1
EphB2R	2H9-MC-fk-PAB-MMAE	25	7, 5
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	175	4, 1
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	150	3, 8
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	120	3, 7
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	10, 7	4, 4
IL-20Ra	IL20Ra-fk-MMAE	26	6, 7
IL-20Ra	IL20Ra-vc-MMAE	27	7, 3
EphB2	IL8-MC-vc-PAB-MMAE	251	3, 7
MDP	MDP-vc-MMAE	32	
MPF	19C ₃ -vc-MMAE	1, 44	6, 5
MPF	7D9-vc-MMAE	4, 3	3, 8
MPF	19C ₃ -vc-MMAE	7, 9	3
MPF	7D9-MC-vc-PAB-MMAF	5	4, 3
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4, 5	4, 6
Napi3b	4C ₉ -vc-MMAE	3, 0	5, 4
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4, 5	4, 8
Napi3b	10H1-vc-MMAF	6, 5	4
NCA	3E6-MC-fk-PAB-MMAE	49, 6	5, 4
NCA	3E6-MC-vc-PAB-MMAE	56, 2	6, 4
PSCA	PSCA-fk-MMAE	51, 7	8, 9
PSCA	PSCA-vc-MMAE	61, 1	8, 6
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAE	75	4, 2
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAF	95	4, 4
Napi3b	10H1-MC-MMAF	92	4

EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	79	5
EphB2R	2H9-MC-MMAF	92	4,9
0772P	11D10 (quimera de Fc)-MC-vc-PAB-MMAE	79	4,3
0772P	11D10 (quimera de Fc)-MC-vc-PAB-MMAF	70	4,5
0772P	11D10 (quimera de Fc)-MC-MMAF	23	4,5
Brevican	6D2-MC-vc-PAB-MMAF	0,3	4,5
Brevican	6D2-MC-MMAF	0,36	4,5
EphB2R	2H9 (quimera de Fc)-MC-vc-PAB-MMAE	1983	4,3
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	14,1	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAF	16,4	4,5
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	10,5	4,1
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAF	10,2	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	58,6	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	8	3,1
0772P	11D10 (quimera de Fc)-MC-vc-PAB-MMAE	340	3,9
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAE	3,5	4
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAF	4,7	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAE	2	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAF	2,3	4
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	52,2	4,5

4.7 COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

Também é descrita uma composição incluindo uma quantidade eficaz de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar e um portador ou veículo farmacologicamente aceitável. Para conveniência, as unidades de Fármaco e Compostos Fármaco-Ligante e Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando podem ser referidos como Conjugados Exemplares. As composições são adequadas para administração humana e veterinária.

As composições presentes podem estar em qualquer forma que permita que a composição seja administrada a um paciente. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um sólido, líquido ou gás (aerossol). Vias típicas de administração incluem, sem limitação, oral, tópica, parentérica, sublingual, retal, vaginal, ocular, intratumoral, e intranasal. Administração parentérica inclui injeções subcutâneas, injeção intravenosa, intramuscular, intra-esternal ou técnicas de infusão. As composições podem ser administradas parentericamente. Alternativamente, os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições podem ser administrados intravenosamente.

Composições farmacêuticas podem ser formuladas de modo a permitir que um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar esteja biodisponível quando a composição é administrada a um paciente. Composições podem ter a forma de uma ou mais unidades farmacêuticas, onde, por exemplo, um comprimido pode ser uma unidade farmacêutica, e um recipiente de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar na forma aerossol pode conter uma pluralidade de unidades farmacêuticas.

Materiais usados na preparação das composições farmacêuticas podem ser atóxicas na quantidade usada. Ficará evidente para aqueles com especialização ordinária na técnica que a dosagem ideal do(s) princípio(s) ativo(s) na composição farmacêutica dependerá de uma variedade de fatores. Fatores relevantes incluem, sem limitação, o tipo de animal (por exemplo, ser humano), a forma específica do Composto Exemplar ou Conjugado Exemplar, a maneira de administração, e a composição utilizada.

O portador ou veículo farmacêuticamente aceitável pode ser particulado, de modo que as composições estão, por exemplo, na forma de comprimido ou pó. O(s) portador(es) pode(m) ser líquido(s), com as composições sendo, por exemplo, um xarope oral ou líquido injetável. Além disso,

o(s) portador(es) pode(m) ser gasoso(s) ou particulado(s), de modo a proporcionar uma composição aerossol útil, por exemplo, para administração por inalação.

Quando destinada a administração oral, a composição está preferivelmente na forma sólida ou líquida, e formas semissólidas, semilíquidas, em suspensão ou gel estão incluídas dentro das formas consideradas no presente documento como sólidas ou líquidas.

Como uma composição sólida para administração oral, a composição pode ser formulada num pó, grânulo, comprimido, pílula, cápsula, goma de mascar, bolacha ou forma semelhante. Esta composição sólida tipicamente contém um ou mais diluentes inertes. Além disso, um ou mais dentre os seguintes pode estar presente: aglutinantes tais como carboxi metil celulose, etil celulose, celulose microcristalina, ou gelatina; excipientes, tais como amido, lactose ou dextrinas, agentes de desintegração tais como ácido algínico, alginato de sódio, Primogel, amido de milho e semelhantes; lubrificantes tais como estearato de magnésio ou Sterotex; agentes de brilho tais como dióxido de silício; agentes edulcorantes tais como sacarose ou sacarina, um agente aromatizante tal como hortelã, salicilato de metilo ou aromatizante de laranja e um agente de coloração.

Quando a composição estiver na forma de uma cápsula, por exemplo, uma cápsula de gelatina, ela pode conter, além dos materiais do tipo acima, um portador líquido tal como polietilenoglicol, ciclodextrina ou um óleo gordo.

A composição pode estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, um xarope, solução, emulsão ou suspensão. O líquido pode ser útil para administração oral ou para administração por injeção. Quando destinado para administração oral, uma composição pode compreender um ou mais dentre um agente edulcorante, conservantes, tintura/corante e intensificador de sabor. Numa composição

para administração por injeção, um ou mais dentre um tensioativo, conservante, agente de humedecimento, agente dispersante, agente de suspensão, tampão, estabilizador e agente isotônico podem também ser incluídos.

As composições líquidas, sejam soluções, suspensões ou de outra forma semelhante, podem também incluir um ou mais dentre os seguintes: diluentes estéreis tais como água para injeção, solução salina, preferivelmente solução salina fisiológica, solução de Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos tais como mono ou diglicéridos sintéticos que podem servir como solvente ou meio de suspensão, polietileno glicóis, glicerina, ciclodextrina, propileno glicol ou outros solventes; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabeno; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes quelantes tais como ácido etileno diamina tetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para ajuste da tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. Uma composição parentérica pode ser contida numa ampola, uma seringa descartável ou um balão de doses múltiplas feito de vidro, plástico ou outro material. Solução salina fisiológica é um adjuvante exemplar. Uma composição injetável é preferivelmente estéril.

A quantidade de Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar que é eficaz no tratamento de um distúrbio ou condição específica dependerá da natureza da distúrbio ou condição e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. Além disso, ensaios *in vitro* ou *in vivo* podem, opcionalmente, ser utilizados para ajudar a identificar os intervalos de dosagem ideais. A dose precisa a ser utilizada nas composições dependerá também da via de administração, e da gravidade da doença ou distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e com as circunstâncias de cada paciente.

As composições compreendem uma quantidade eficaz de um

Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar de modo que uma dosagem adequada será obtida. Tipicamente, esta quantidade é pelo menos cerca de 0,01 % de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar em peso da composição. Quando destinada a administração oral, esta quantidade pode variar de cerca de 0,1 % a cerca de 80 % em peso da composição. As composições orais podem compreender de cerca de 4 % a cerca de 50 % do Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar em peso da composição. Além disso, as presentes composições podem ser preparadas de modo que uma unidade farmacêutica parentérica contenha de cerca de 0,01 % a cerca de 2 % em peso do Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar.

Para administração intravenosa, a composição pode compreender de cerca de 0,01 a cerca de 100 mg de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar por kg de peso corporal do animal. A composição pode incluir de cerca de 1 a cerca de 100 mg de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar por kg do peso corporal do animal. A quantidade administrada pode estar no intervalo de cerca de 0,1 a cerca de 25 mg/kg de peso corporal do Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar.

De forma geral, a dosagem de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar administrada a um paciente é tipicamente de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 2000 mg/kg de peso corporal do animal. A dosagem administrada a um paciente pode estar entre cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal do animal ou a dosagem administrada a um paciente pode estar entre cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 250 mg/kg de peso corporal do animal; em ainda um outro aspeto, a dosagem administrada a um paciente está entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 20 mg/kg de peso corporal do animal ou a dosagem administrada está entre cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal do animal, ou a dosagem administrada está entre cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de peso corporal do animal.

Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições podem ser administrados por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção em bolo, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.). A administração pode ser sistêmica ou local. Vários sistemas de administração são conhecidos, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., e podem ser usados para administrar um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar ou composição. Em certos casos, mais que um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar ou composição é administrado a um paciente.

Em casos específicos, pode ser desejado administrar um ou mais Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições localmente à área que necessita de tratamento. Isto pode ser obtido, por exemplo, e não de forma limitativa, por infusão local durante cirurgia; aplicação tópica, por exemplo, em conjunto com um curativo após cirurgia; por injeção, por meios de um cateter, por meio de um supositório; ou por meio de um implante, sendo o implante de um material poroso ou não poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas, tais como membranas sialásticas, ou fibras. Num exemplo, a administração pode ser por injeção direta no local (ou antigo local) de um cancro, tumor ou tecido neoplástico ou pré-neoplásico. Num outro exemplo, a administração pode ser por injeção direta no local (ou antigo local) de uma manifestação de uma doença autoimune.

Em certos casos, pode ser desejável introduzir um ou mais Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições no sistema nervoso central por uma via adequada, incluindo injeção intraventricular e intratecal. Injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, por exemplo, unido a um reservatório, tal

como um reservatório de Ommaya.

Administração pulmonar pode também ser utilizada, por exemplo, através da utilização de um inalador ou nebulizador, e formulação com um agente para aerossol, ou via perfusão num tensioativo pulmonar de fluorocarbono ou sintético.

Em ainda um outro exemplo, os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições podem ser administrados num sistema de libertação controlada, tal como, mas não limitado, uma bomba ou vários materiais poliméricos podem ser usados. Em ainda um outro exemplo, um sistema de libertação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo dos Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares ou composições, por exemplo, o cérebro, dessa maneira requerendo apenas uma fração da dose sistémica (veja-se, por exemplo, Goodson, no *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, páginas 115-118 (1984)). Outros sistemas de libertação controlada discutidos na análise por Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)) podem ser usados.

O termo "portador" refere-se a um diluente, adjuvante ou excipiente, com o qual um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar é administrado. Estes portadores farmacêuticos podem ser líquidos, tal como água e óleos, incluindo aqueles de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e semelhantes. Os portadores podem ser solução salina, goma acácia, gelatina, pasta de amido, talco, ceratina, sílica coloidal, ureia, e semelhantes. Além disso, agentes auxiliares, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e corantes podem ser usados. Num exemplo, quando administrado a um paciente, o Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar ou composições e portadores farmacêuticamente aceitáveis são estéreis. Água é um portador exemplar quando os Compostos Exemplares

e/ou Conjugados Exemplares são administrados intravenosamente. Soluções salinas e soluções de dextrose e glicerol aquosas podem também ser utilizadas como portadores líquidos, especificamente para soluções injetáveis. Portadores farmacêuticos adequados também incluem excipientes tais como amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, nata seca de leite, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes. As presentes composições, se for desejado, podem também conter quantidades mínimas de agentes de humedecimento e emulsificantes, ou agentes tampão de pH.

As presentes composições podem ter a forma de soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, contas, cápsulas, cápsulas contendo líquidos, pós, formulações de libertação sustentada, supositórios, emulsões, aerossóis, pulverizadores, suspensões, ou qualquer outra forma adequada para utilização. Outros exemplos de portadores farmacêuticos adequados são descritos por E.W. Martin na "Remington's Pharmaceutical Sciences".

Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares podem ser formulados de acordo com procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa a animais, particularmente seres humanos. Tipicamente, os portadores ou veículos para administração intravenosa são soluções tampão aquosas, estéreis e isotônicas. Onde necessário, as composições podem também incluir um agente solubilizante. Composições para administração intravenosa podem, opcionalmente, compreender um anestésico local tal como lignocaína para aliviar a dor no local da injeção. De forma geral, os ingredientes são supridos tanto separadamente como misturados na forma farmacêutica unitária, por exemplo,

como um pó liofilizado seco ou concentrado isento de água, num recipiente hermeticamente vedado tal como uma ampola ou saqueta indicando a quantidade do agente ativo. Onde um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar é para ser administrado por infusão, pode ser distribuído, por exemplo, com uma garrafa de infusão contendo água ou solução salina de grau farmacêutico estéril. Onde o Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar é administrado por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser provida, de modo que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

Composições para administração oral podem estar na forma de comprimidos, pastilhas, suspensões aquosas ou oleosas, grânulos, pós, emulsões, cápsulas, xaropes, ou elixires, por exemplo. Composições administradas oralmente podem conter, opcionalmente, um ou mais agentes, por exemplo, agentes edulcorantes tais como frutose, aspartame ou sacarina; agentes aromatizantes tais como hortelã, óleo de gualtéria, ou cereja; agentes corantes; e agentes conservantes, para proporcionar uma preparação farmacologicamente palatável. Além do mais, quando na forma de comprimido ou pílula, as composições podem ser revestidas para retardar a desintegração e absorção no trato gastrointestinal, proporcionando assim uma ação sustentada durante um período prolongado de tempo. Membranas seletivamente permeáveis, envolvendo um composto de ação osmoticamente ativo, são também adequadas para compostos administrados oralmente. Nestas plataformas posteriores, fluido do ambiente envolvendo a cápsula é embebido pelo composto de ação, que incha para deslocar o agente ou composição de agente através de uma abertura. Estas plataformas de administração podem proporcionar um perfil de administração de ordem essencialmente zero em oposição a perfis perfurados de formulações de libertação imediata. Um material de atraso de tempo tal como

monoestearato de glicerol ou estearato de glicerol pode também ser usado.

As composições podem ser destinadas a administração tópica, caso em que o portador pode estar na forma de uma solução, emulsão, unguento ou base de gel. Se destinado para administração transdérmica, a composição pode estar na forma de um curativo transdérmico ou um dispositivo de iontoforese. Formulações tópicas podem compreender uma concentração de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar de cerca de 0,05 % a cerca de 50 % peso/volume (peso por unidade de volume da composição); num outro aspeto, de 0,1 % a 10 % p/v.

A composição pode ser destinada a administração retal, na forma, por exemplo, de um supositório que irá derreter no reto e libertar o Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar.

A composição pode incluir vários materiais que modificam a forma física de uma unidade farmacêutica sólida ou líquida. Por exemplo, a composição pode incluir materiais que formam uma proteção de revestimento ao redor dos ingredientes ativos. Os materiais que formam o revestimento protetor são tipicamente inertes, e podem ser selecionados de, por exemplo, açúcar, goma-laca, e outros agentes de revestimento entéricos. Alternativamente, os ingredientes ativos podem ser envolvidos numa cápsula de gelatina.

As composições podem consistir em unidades farmacêuticas gasosas, por exemplo, podem estar na forma de aerossol. O termo aerossol é usado para denotar uma variedade de sistemas que variam daqueles de natureza coloidal até aqueles sistemas que consistem de pacotes pressurizados. A administração pode ser feita através de um gás liquefeito ou comprimido ou através de um sistema de bomba adequado que distribui os ingredientes ativos.

Se na forma sólida, líquida ou gasosa, as presentes

composições podem incluir um agente farmacológico usado no tratamento de cancro, uma doença autoimune ou uma doença infecciosa.

4.8 USOS TERAPÊUTICOS DOS CONJUGADOS EXEMPLARES

Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares são úteis para tratar cancro, uma doença autoimune ou uma doença infecciosa num paciente.

4.8.1 TRATAMENTO DE CANCRO

Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares são úteis para inibir a multiplicação de uma célula tumoral ou célula cancerígena, causar apoptose numa célula tumoral ou cancerígena, ou para tratar cancro num paciente. Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares podem ser usados, consequentemente, numa variedade de configurações para o tratamento de cancros em animais. Os Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando podem ser usados para administrar um Fármaco ou unidade de Fármaco a uma célula tumoral ou célula cancerígena. Sem estar limitado pela teoria, numa forma de realização, a unidade de Ligando de um Conjugado Exemplar liga-se ou associa-se a um antigénio associado a uma célula cancerígena ou célula tumoral, e o Conjugado Exemplar pode ser absorvido dentro de uma célula tumoral ou célula cancerígena através de endocitose mediada por recetor. O antigénio pode ser unido a uma célula tumoral ou célula cancerígena ou pode ser uma proteína de matriz extracelular associada à célula tumoral ou célula cancerígena. Uma vez dentro da célula, uma ou mais sequências peptídicas específicas dentro da unidade de Ligante são hidroliticamente clivadas por uma ou mais proteases associadas à célula tumoral ou célula cancerígena, resultando na libertação de um Fármaco ou um Composto de Fármaco-Ligante. O Fármaco libertado ou Composto de Fármaco-Ligante está, então, livre para migrar dentro da célula e induzir atividades citotóxicas ou citostáticas. Numa forma de realização alternativa, o

Fármaco ou unidade de Fármaco é clivado do Conjugado Exemplar fora da célula tumoral ou célula cancerígena, e o Fármaco ou Composto de Fármaco-Ligante penetra subsequentemente na célula.

Num exemplo, a unidade de Ligando liga-se à célula tumoral ou célula cancerígena.

Num outro exemplo, a unidade de Ligando liga-se a um antígeno de célula tumoral ou célula cancerígena que está na superfície da célula tumoral ou célula cancerígena.

Num outro exemplo, a unidade de Ligando liga-se a um antígeno de célula tumoral ou célula cancerígena que é uma proteína de matriz extracelular associada à célula tumoral ou célula cancerígena.

A especificidade da unidade de Ligando para uma célula tumoral ou célula cancerígena pode ser importante para determinar aqueles tumores ou cancros que são mais eficazmente tratados. Por exemplo, Conjugados Exemplares que tem uma unidade de Ligando BR96 podem ser úteis para tratar carcinomas de antígeno positivo incluindo aqueles do pulmão, mama, cólon, ovários, e pâncreas. Conjugados Exemplares que tem uma unidade de Ligando Anti-CD30 ou anti-CD40 podem ser úteis para o tratamento de malignidades hematológicas.

Outros tipos particulares de cancros que podem ser tratados com Conjugados Exemplares incluem, mas não se limitam àqueles apresentados no Quadro 3.

QUADRO 3

Tumores sólidos incluindo, mas não limitados a:

Fibrossarcoma

Mixossarcoma

Lipossarcoma

Condrossarcoma

Sarcoma osteogénico

Cordoma

Angiossarcoma

Endoteliossarcoma
Linfangiossarcoma
Linfangioendoteliossarcoma
Sinovioma
Mesotelioma
Tumor de Ewing
Leiomiossarcoma
Rabdomiossarcoma
Cancro do cólon
Cancro colorretal
Cancro dos rins
Cancro pancreático
Cancro ósseo
Cancro de mama
Cancro do ovário
Cancro prostático
Cancro esofágico
Cancro estomacal
Cancro oral
Cancro nasal
Cancro da garganta
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de célula basal
Adenocarcinoma
Carcinoma da glândula sudorífera
Carcinoma da glândula sebácea
Carcinoma papilar
Adenocarcinomas papilares
Cistadenocarcinoma
Carcinoma medular
Carcinoma broncogénico
Carcinoma de célula renal
Hepatoma
Carcinoma do duto biliar
Coriocarcinoma

Seminoma
Carcinoma embrionário
Tumor de Wilms
Cancro do colo do útero
Cancro uterino
Cancro testicular
Carcinoma pulmonar de célula pequena
Carcinoma de bexiga
Cancro do pulmão
Carcinoma epitelial
Glioma
Glioblastoma multiforme
Astrocitoma
Meduloblastoma
Craniofaringioma
Ependimoma
Pinealoma
Hemangioblastoma
Neuroma acústico
Oligodendroglioma
Meningioma
Cancro da pele
Melanoma
Neuroblastoma
Retinoblastoma
Cancros originários do sangue, incluindo, mas não limitados a:
Leucemia linfoblástica aguda "ALL"
Leucemia de célula B linfoblástica aguda
Leucemia de célula T linfoblástica aguda
Leucemia mieloblástica aguda "AML"
Leucemia promielocítica aguda "APL"
Leucemia monoblástica aguda
Leucemia eritroleucémica aguda
Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia não linfocítica aguda
Leucemia não diferenciada aguda
Leucemia mielocítica crónica "CML"
Leucemia linfocítica crónica "CLL"
Leucemia de célula capilar
Mieloma múltiplo
Leucemias agudas e crónicas:
Linfoblástica
Mielógena
Linfocítica
Leucemias mielocíticas
Linfomas:
Doença de Hodgkin
Linfoma não Hodgkin
Mieloma múltiplo
Macroglobulinemia de Waldenström
Doença de cadeia pesada
Policitemia vera

Os Conjugados Exemplares proporcionam direcionamento de conjugação específica a tumor ou cancro, reduzindo dessa maneira a toxicidade geral destes compostos. As unidades Ligadoras estabilizam os Conjugados Exemplares no sangue, e ainda são cliváveis pelas proteases específicas do tumor dentro da célula, libertando um Fármaco.

4.8.2 TERAPÊUTICA DE MÚLTIPLAS MODALIDADES PARA CANCRO

Cancros, incluindo, mas não limitados a um tumor, metástase, ou outra doença ou distúrbio caracterizada por crescimento celular descontrolado, podem ser tratados ou prevenidos pela administração de um Conjugado Exemplar e/ou um Composto Exemplar.

Métodos para tratar ou prevenir cancro são descritos no presente documento, incluindo a administração de uma quantidade eficaz de um Conjugado Exemplar e um agente

quimioterápico a um paciente em necessidade dos mesmos. Num exemplo, o agente quimioterápico é aquele com o qual o tratamento do cancro não foi considerado refratário. Num outro exemplo, o agente quimioterápico é aquele com o qual o tratamento de cancro foi considerado refratário. Os Conjugados Exemplares podem ser administrados a um paciente que também foi submetido a cirurgia como tratamento de cancro.

Num exemplo, o método adicional de tratamento é terapêutica de radiação.

Num exemplo específico, o Conjugado Exemplar é administrado concomitantemente com o agente quimioterápico ou com terapêutica de radiação. Num outro exemplo específico, o agente quimioterápico ou terapêutica de radiação é administrado antes ou subsequentemente à administração de um Conjugado Exemplar, por exemplo, pelo menos uma hora, cinco horas, 12 horas, um dia, uma semana, um mês ou vários meses (por exemplo, até três meses), anteriormente ou subsequentemente à administração de um Conjugado Exemplar.

Um agente quimioterápico pode ser administrado durante uma série de sessões. Qualquer um ou uma combinação dos agentes quimioterápicos listados no quadro 4 pode ser administrado. Com relação à radiação, qualquer protocolo de terapêutica de radiação pode ser usado, dependendo do tipo de cancro a ser tratado. Por exemplo, mas não de forma limitativa, radiação de raio x pode ser administrada; em especial, megavoltagem de alta energia (radiação maior que 1 MeV de energia) pode ser usada para tumores profundos, e feixe de elétron e radiação de raio X de ortovoltagem pode ser usada para cancros da pele. Radioisótopos que emitem raio gama, tal como isótopos radioativos de rádio, cobalto e outros elementos, podem também ser administrados.

Adicionalmente, são descritos métodos de tratamento de cancro com um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar

como uma alternativa à quimioterapia ou terapêutica de radiação, quando a quimioterapia ou a terapêutica de radiação são ou podem ser muito tóxicas, por exemplo, resultando em efeitos secundários inaceitáveis ou insuportáveis, para os indivíduos que estão recebendo o tratamento. O animal que está a ser tratado pode, opcionalmente, ser tratado com um outro tratamento para cancro tal como cirurgia, terapêutica de radiação ou quimioterapia, dependendo de qual tratamento seria aceitável ou suportável.

Os Compostos Exemplares e/ou Conjugados Exemplares podem também ser usados de uma maneira *in vitro* ou *ex vivo*, como para o tratamento de certos cancros, incluindo, mas não limitados a leucemias e linfomas, este tratamento envolvendo transplantes de célula estaminal autóloga. Isto pode envolver um processo de etapas múltiplas, no qual as células estaminais hematopoiéticas autólogas do animal são colhidas e purgadas de todas as células cancerígenas; a população de célula da medula óssea remanescente do animal é, então, erradicada através da administração de uma alta dose de um Composto Exemplar e/ou Conjugado Exemplar com ou sem o acompanhamento de uma alta dose de terapêutica de radiação, e o enxerto de célula estaminal é infundido de volta no animal. Tratamento de suporte é, então, proporcionado enquanto a função da medula óssea é restaurada e o animal se recupera.

4.8.3 TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS MÚLTIPLOS PARA CANCRO

Métodos para o tratamento de cancro incluindo a administração a um paciente em necessidade do mesmo de uma quantidade eficaz de um Conjugado Exemplar e um outro agente terapêutico que é um agente anti-cancro são apresentados. Agentes anticancro adequados incluem, mas não são limitados a metotrexato, taxol, L-asparaginase, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiureia, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatina,

carboplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbazina, topotecano, mostardas nitrogenadas, citoxan, etoposido, 5-fluorouracil, BCNU, irinotecano, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, aspariginase, vimblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel. Num aspeto, o agente anti-cancro inclui, mas não se limita a um fármaco listado no Quadro 4.

QUADRO 4

Agentes de alquilação	
Mostardas nitrogenadas:	Ciclofosfamida ifosfamida trofosfamida clorambucil melfalano
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	Bussulfano
	treossulfano
Triazenos:	Decarbazina
Compostos contendo platina:	Cisplatina Carboplatina
Alcaloides vegetais	
Alcaloides vinca:	Vincristina Vimblastina Vindesina Vinorelbina
taxoides:	Paclitaxel Docetaxol
Inibidores de topoisomerasas de ADN	

Epipodofilinas:	Etoposido Teniposido Topotecano 9-aminocamptotecina Camptotecina Crisnatol
mitomicinas:	mitomicina C
Antimetabolitos	
Antifolatos:	
Inibidores de DHFR:	Metotrexato Trimetrexato
Inibidores de desidrogenase IMP	Ácido micofenólico Tiazofurina Ribavirina EICAR
Inibidores de redutase de ribonucleótido:	Hidroxiureia Deferoxamina
Análogos de pirimidina:	
Análogos de uracilo	5-fluorouracilo
	Floxuridina Doxifluridina Ratitrexed
Análogos de citosina	Citarabina (ara C) Citosina arabinósido Fludarabina
Análogos de purina:	Mercaptopurina Tioguanina
Terapêuticas hormonais:	
Rntagonistas de recetores:	
Antiestrogénio	Tamoxifeno Raloxifeno Megestrol

Agonistas de LHRH:	Goserrelina Acetato de leuprolida
Antiandrogénios:	Flutamida Bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
Análogos de vitamina D3:	EB 1089 CB 1093 KH 1060
Retinoides/Deltoides	
Terapêuticas fotodinâmicas:	Vertoporfina (BPD-MA) Ftalocianina Fotossensibilizador Pc4 demetoxi-hipocreline A (2BA-2-DMHA)
Citocinas:	Interferão- α Interferão- γ Fator de necrose tumoral
Outros:	Gemcitabina Velcade Revamid Talamid
Inibidores de isoprenilação:	Lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ião 1-metil-4-fenilpiridínio
Inibidores de ciclo celular:	Estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	Dactinomicina
Bleomicinas:	Bleomicina A2 Bleomicina B2 Peplomicina

Antraciclinas:	Daunorrubicina Doxorrubicina (adriamicina) Idarrubicina Epirubicina Pirarrubicina Zorubicina mitoxantrona
Inibidores de MDR:	Verapamil
Inibidores de Ca ²⁺ ATPase:	Tapsigargina

4.8.4 TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES

Os Conjugados Exemplares são úteis para eliminar ou inibir a replicação de uma célula que produz uma doença autoimune ou para o tratamento de uma doença autoimune. Os Conjugados Exemplares podem ser usados adequadamente numa variedade de configurações para o tratamento de uma doença autoimune num paciente. Os Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando podem ser usados para administrar um Fármaco a uma célula alvo. Sem estar limitado pela teoria, o Conjugado de Fármaco-Ligante-Ligando pode associar-se com um antigénio na superfície de uma célula alvo, e o Conjugado Exemplar é, então, absorvido dentro de uma célula alvo através de uma endocitose mediada por recetor. Uma vez dentro da célula, uma ou mais sequências peptídicas específicas dentro da unidade de Ligante são enzimaticamente ou hidroliticamente clivadas, resultando na libertação de um Fármaco. O Fármaco libertado está, então, livre para migrar no citosol e induzir atividades citotóxicas ou citostáticas. Num exemplo alternativo, o Fármaco é clivado do Conjugado Exemplar fora da célula alvo, e o Fármaco penetra subsequentemente na célula.

Num exemplo, a unidade de Ligando liga-se a um antigénio autoimune. Num aspeto, o antigénio está na superfície de uma célula envolvida numa condição autoimune.

Num outro exemplo, a unidade de Ligando liga-se a um antígeno autoimune que está na superfície de uma célula.

Num exemplo, o Ligando liga-se a linfócitos ativados que estão associados ao estado da doença autoimune.

Num exemplo adicional, os Conjugados Exemplares destroem ou inibem a multiplicação de células que produzem um anticorpo autoimune associado a uma doença autoimune específica.

Tipos específicos de doenças autoimunes que podem ser tratados com os Conjugados Exemplares incluem, mas não se limitam a distúrbios relacionados com linfócito Th2 (por exemplo, dermatite atópica, asma atópica, rinoconjuntivite, rinite alérgica, síndrome de Omenn, esclerose sistémica, e doença de enxerto versus hospedeiro); distúrbios relacionados com linfócito Th1 (por exemplo, artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase, síndrome de Sjorgren, tireoidite de Hashimoto, doença de Grave, cirrose biliar primária, granulomatose de Wegener, e tuberculose); distúrbios relacionados com linfócito B ativado (por exemplo, lúpus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artrite reumatoide, e diabetes tipo I), e aquelas apresentadas no Quadro 5.

QUADRO 5

Hepatite Ativa Crónica
Doença de Addison
Alveolite Alérgica
Reação Alérgica
Rinite Alérgica
Síndrome de Alport
Anafilaxia
Espondilite anquilosante
Síndrome antifosfolípido
Artrite
Ascariase
Aspergilose

Alergia Atópica
Dermatite Atrópica
Rinite Atrópica
Doença de Behcet
Pulmão de "Bird-Fancier"
Asma brônquica
Síndrome de Caplan
Cardiomiopatia
Doença celíaca
Doença de Chagas
Glomerulonefrite crónica
Síndrome de Cogan
Doença de Aglutinina Fria
Infecção por Rubéola Congénita
Síndrome de CREST
Doença de Crohn
Crioglobulinemia
Síndrome de Cushing
Dermatomiosite
Lúpus Discoide
Síndrome de Dressier
Síndrome de Eaton-Lambert
Infecção por Echovírus
Encefalomielite
Oftalmopatia endócrina
Infecção por Vírus Epstein-Barr
Asma equina
Eritematose
Síndrome de Evan
Síndrome de Felty
Fibromialgia
Ciclite de Fuch
Atrofia Gástrica
Alergia Gastrintestinal
Arterite de Células Gigantes

Glomerulonefrite
Síndrome de Goodpasture
Doença do Enxerto contra Hospedeiro
Doença de Grave
Doença de Guillain-Barre
Tireoidite de Hashimoto
Anemia hemolítica
Púrpura de Henoch-Schonlein
Atrofia Adrenal Idiopática
Fibrite Pulmonar Idiopática
Nefropatia de IgA
Enteropatias Intestinais Inflamatórias
Diabetes Mellitus dependente de Insulina
Artrite Juvenil
Diabetes Mellitus Juvenil (Tipo 1)
Síndrome de Lambert-Eaton
Laminite
Líquen plano
Hepatite Lupoide
Lúpus
Linfopenia
Doença de Meniere
Doença de Tecido Conectivo Mista
Esclerose Múltipla
Miastenia Gravis
Anemia Perniciosa
Síndromes Poliglandulares
Demência Pré-senil
Agamaglobulinemia Primária
Cirrose Biliar Primária
Psoríase
Artrite Psoriática
Fenómeno de Raynauds
Aborto Recorrente
Síndrome de Reiter

Febre Reumática
Artrite Reumatoide
Síndrome de Sampter
Esquistossomose
Síndrome de Schmidt
Esclerodermia
Síndrome de Shulman
Síndrome de Sjorgen
Síndrome do Homem Rígido
Oftalmia Simpática
Lúpus Eritematoso Sistêmico
Arterite de Takayasu
Arterite Temporal
Tireoidite
Trombocitopenia
Tirotoxicose
Necrólise Epidérmica Tóxica
Resistência à Insulina Tipo B
Diabetes Mellitus Tipo 1
Colite Ulcerativa
Uveíte
Vitiligo
Macroglobulinemia de Waldenstrom
Granulomatose de Wegener

4.8.5 TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS MÚLTIPLOS PARA DOENÇAS AUTOIMUNES

Métodos para o tratamento de uma doença autoimune são também revelados incluindo a administração a um paciente em necessidade do mesmo de uma quantidade eficaz de um Conjugado Exemplar e um outro agente terapêutico conhecido para o tratamento de uma doença autoimune. Num exemplo, o agente de doença anti-autoimune inclui, mas não se limita aos agentes listados no Quadro 6.

Quadro 6

Ciclosporina
Ciclosporina A
micofenilato mofetil
Sirolimus
Tacrolimus
Enanercept
Prednisona
Azatioprina
metotrexato ciclofosfamida
Prednisona
Ácido aminocaproico
Cloroquina
Hidroxicloroquina
Hidrocortisona
Dexametasona
Clorambucil
DHEA
Danazol
Bromocriptina
Meloxicam
Infliximab

4.8.6 TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECIOSAS

Os Conjugados Exemplares são úteis para eliminar ou inibir a multiplicação de uma célula que produz uma doença infecciosa ou para o tratamento de uma doença infecciosa. Os Conjugados Exemplares podem ser usados adequadamente numa variedade de configurações para o tratamento de uma doença infecciosa num paciente. Os Conjugados de Fármaco-Ligante-Ligando podem ser usados para administrar um Fármaco a uma célula alvo. Num exemplo, a unidade de Ligando liga-se à célula da doença infecciosa.

Numa exemplo, os Conjugados eliminam ou inibem a multiplicação de células que produzem uma doença infecciosa

específica.

Tipos específicos de doenças infecciosas que podem ser tratadas com os Conjugados Exemplares incluem, mas não se limitam às aquelas apresentadas no Quadro 7.

QUADRO 7

Doenças Bacterianas:

Difteria
Tosse convulsa
Bacterinemia Oculta
Infecção do Trato Urinário
Gastroenterite
Celulite
Epiglotidite
Traqueíte
Hipertrofia do Tecido Adenoide
Abscesso Retrofaríngeo
Impetigo
Ectimia
Pneumonia
Endocardite
Artrite Séptica
Pneumococose
Peritonite
Bacteriemia
Meningite
Meningite Purulenta Aguda
Uretrite
Cervicite
Proctite
Faringite
Salpingite
Epididimite
Gonorreia
Sífilis
Listeriose

Carbúnculo
Nocardiose
Salmonelose
Febre tifoide
Disenteria
Conjuntivite
Sinusite
Brucelose
Tularemia
Cólera
Peste Bubónica
Tétano
Enterite Necrosante
Actinomicose
Infecção Anaeróbica Mista
Sífilis
Febre Recorrente
Leptospirose
Doença de Lyme
Febre da mordida de rato
Tuberculose
Linfadenite
Lepra
Clamidiose
Pneumonia por Clamídia
Tracoma
Conjuntivite de Inclusão
Doenças Fúngicas Sistémicas:
Histoplasmose
Coccidioidomicose
Blastomicose
Esporotricose
Criptococose
Candidiase Sistémica
Aspergilose

Mucormicose

Micetoma

Cromomicose

Doenças por Rickettsias:

Tifo

Febre Maculosa das Montanhas Rochosas

Erliquiose

Rickettsiose Transmitida por Carraças do Leste

Varíola por rickettsia

Febre Q

Bartonelose

Doenças Parasitárias:

Malária

Babesiose

Doença do Sono Africana

Doença de Chagas

Leishmaniose

Febre Dum-Dum

Toxoplasmose

Meningoencefalite

Ceratite

Entamebíase

Giardíase

Criptosporidiose

Isosporiose

Ciclosporiase

Microsporidiose

Ascaríase

Infeção dos vermes intestinais

Infeção por ancilóstoma duodenal

Infeção por nematoide

Larva Migrans Ocular

Triquinose

Doença pelo verme da Guiné

Filaríase Linfática

Loíase
Cegueira "River"
Infecção por Dirofilária Canina
Esquistossomose
Prurido dos Nadadores
Trematodo Pulmonar Oriental
Trematodo Hepático Oriental
Fasciolíase
Fasciolopsíase
Opistorquíase
Infecções por ténia
Doença Hidatídica
Doença Hidatídica Alveolar

Doenças Virais:

Sarampo
Panencefalite esclerosante subaguda
Constipação
Papeira
Rubéola
Roséola
Quinta Doença
Varicela
Infecção viral sincicial respiratória
Laringotraqueobronquite
Bronquiolite
Mononucleose Infeciosa
Poliomielite
Herpangina
Doença da mão-pé-e-boca
Doença de Bornholm
Herpes Genital
Verruga Genital
Meningite Asséptica
Miocardite
Pericardite

Gastroenterite
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)
Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)
Síndrome de Reye
Síndrome de Kawasaki
Influenza
Bronquite
Pneumonia Atípica
Doença Respiratória Febril Aguda
Febre Faringoconjuntival Aguda
Ceratconjuntivite Epidémica
Vírus da Herpes Simplex 1 (HSV-1)
Vírus da Herpes Simplex 2 (HSV-2)
Herpes Zoster
Doença de Inclusão Citomegálica
Raiva
Leucoencefalopatia Progressiva Multifocal
Kuru
Insónia Familiar Fatal
Doença de Creutzfeldt-Jakob
Doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker
Paraparesia Espástica Tropical
Encefalite da Califórnia
Encefalite de St. Louis
Febre Amarela
Dengue
Coriomeningite Linfocítica
Febre de Lassa
Febre Hemorrágica
Síndrome Pulmonar do Hantavírus
Infeções por Vírus Marburg
Infeções por Vírus Ebola
Varíola

4.8.7 TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS MÚLTIPLOS PARA DOENÇAS INFECIOSAS

São apresentados métodos para o tratamento de uma doença infecciosa incluindo a administração a um paciente em necessidade do mesmo de um Conjugado Exemplar e um outro agente terapêutico que é um agente anti-doença infecciosa. Num exemplo, o agente anti-doença infecciosa são agentes listados no Quadro 8, mas não limitados a eles.

QUADRO 8

Antibióticos β -Lactâmicos:

Penicilina G
Penicilina V
Cloxacilina
Dicloxacilina
Meticilina
Nafcilina
Oxacilina
Ampicilina
Amoxicilina
Bacampicilina
Azlocilina
Carbenicilina
Mezlocilina
Piperacilina
Ticarcilina

Aminoglicosídeos:

Amicacina
Gentamicina
Canamicina
Neomicina
Netilmicina
Estreptomicina
Tobramicina

Macrólidos:

Azitromicina

Claritromicina

Eritromicina

Lincomicina

Clindamicina

Tetraciclinas:

Demeclociclina

Doxiciclina

Minociclina

Oxitetraciclina

Tetraciclina

Quinolonas:

Cinoxacina

Ácido nalidíxico

Fluoroquinolonas:

Ciprofloxacina

Enoxacina

Grepafloxacina

Levofloxacina

Lomefloxacina

Norfloxacina

Ofloxacina

Esparfloxacina

Trovafloxicina

Polipéptidos:

Bacitracina

Colistina

Polimixina B

Sulfonamidas:

Sulfisoxazol

Sulfametoxazol

Sulfadiazina

Sulfametizol

Sulfacetamida

Agentes Antibacterianos Variados:

Trimetoprim

Sulfametazol
Cloranfenicol
Vancomicina
Metronidazol
Quinupristina
Dalfopristina
Rifampina
Espectinomicina
Nitrofurantoína
Agentes Antivirais

Agentes Antivirais Gerais:

Idoxuradina
Vidarabina
Trifluridina
Aciclovir
Fanciciclovir
Penciciclovir
Valaciclovir
Ganciciclovir
Foscarnet
Ribavirina
Amantadina
Rimantadina
Cidofovir
Oligonucleótidos Antissense
Imunoglobulinas
Interferões

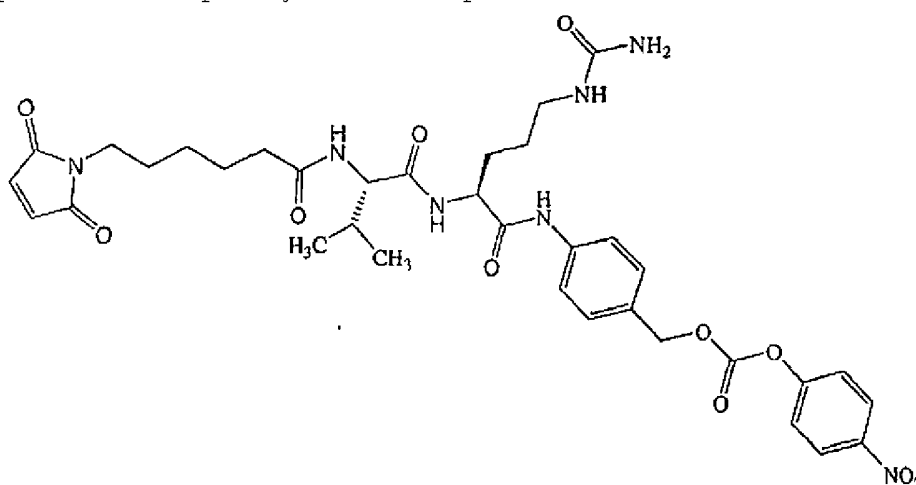
Fármacos para Infecção por VIH:

Tenofovir
Entricitabina
Zidovudina
Didanosina
Zalcitabina
Estavudina
Lamivudina

Neviparina
 Delavirdina
 Saquinavir
 Ritonavir
 Indinavir
 Nelfinavir

5. EXEMPLOS

Exemplo 1 - Preparação do composto AB



AB

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 eq., Patente US N° 6214345 de Firestone et al.) foi diluído com DMF (120 ml, 0,2 M) e a esta solução foi adicionada dietilamina (60 ml). A reação foi monitorizada por HPLC e foi completada em 2 horas. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo resultante foi precipitado usando acetato de etilo (ca. 100 ml) sob exposição a ondas sonoras durante 10 minutos. Éter (200 ml) foi adicionado e o precipitado foi exposto a ondas sonoras adicionalmente durante 5 minutos. A solução foi deixada descansar durante 30 minutos sem agitação e foi, então, filtrada e seca sob vácuo elevado para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g 21 mmol)

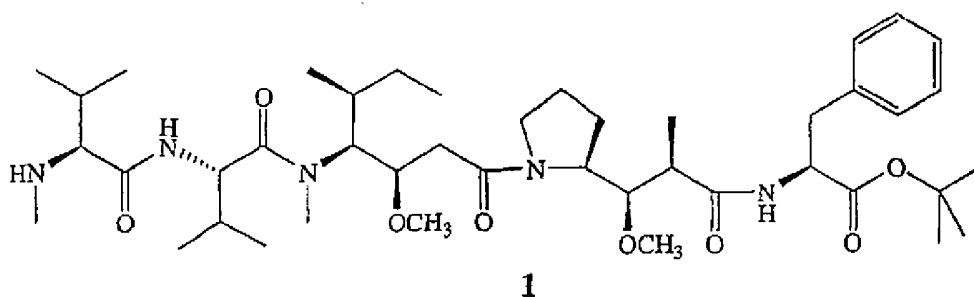
foi diluído com DMF (110 ml) e a solução resultante foi tratada com MC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:251; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 eq.). A reação foi completada após 2 horas de acordo com HPLC. A mistura de reação foi concentrada e o óleo resultante foi precipitado usando acetato de etilo (50 ml). Após exposição a ondas sonoras durante 15 minutos, éter (400 ml) foi adicionado e a mistura foi exposta a ondas sonoras adicionalmente até todas as partículas grandes serem quebradas. A solução foi, então, filtrada e o sólido foi seco para proporcionar um intermediário sólido esbranquiçado. Rendimento: 11,63 g (96 %); ES-MS m/z 757,9 [M-H]

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 eq., Patente US N° 6214345 de Firestone et al.) foi diluído com DMF (120 ml, 0,2 M) e a esta solução foi adicionada dietilamina (60 ml). A reação foi monitorizada por HPLC e foi completada em 2 horas. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo resultante foi precipitado usando acetato de etilo (ca. 100 ml) sob exposição a ondas sonoras durante 10 minutos. Éter (200 ml) foi adicionado e o precipitado foi exposto a ondas sonoras adicionalmente durante 5 minutos. A solução foi deixada descansar durante 30 minutos sem agitação e foi, então, filtrada e seca sob vácuo elevado para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g 21 mmol) foi diluído com DMF (110 ml) e a solução resultante foi tratada com MC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:521; 6,5 g 21 mmol, 1,0 eq.). A reação foi completada após 2 horas, de acordo com HPLC. A mistura de reação foi concentrada e o óleo resultante foi precipitado usando acetato de etilo (50 ml). Após exposição a ondas sonoras durante 15 minutos, éter (400 ml) foi adicionado e a mistura foi exposta a ondas sonoras adicionalmente até todas as partículas grandes serem quebradas. A solução foi,

então, filtrada e o sólido foi seco para proporcionar um intermediário sólido esbranquiçado. Rendimento: 11,63 g (96 %); ES-MS m/z 757,9 [M-H].

O intermediário sólido esbranquiçado (8,0 g, 14,0 mmol) foi diluído com DMF (120 ml, 0,12 M) e à solução resultante foi adicionado bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g 28,0 mmol, 2,0 eq.) e DIEA (3,66 ml, 21,0 mmol, 1,5 eq.). A reação estava completa em 1 hora de acordo com HPLC. A mistura de reação foi concentrada para proporcionar um óleo que foi precipitado com EtOAc, e então triturado com EtOAc (ca. 25 ml). O soluto foi precipitado adicionalmente com éter (ca. 200 ml) e triturado durante 15 minutos. O sólido foi filtrado e seco sob vácuo elevado para proporcionar o Composto AB que era 93 % puro de acordo com HPLC e usado na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento: 9,7 g (94 %).

Exemplo 2 - Preparação do Composto 1



Sal de HCl de éster t-butílico de fenilalanina (868 mg, 3 mmol), N-Boc- Dolaproína (668 mg, 1 eq.), DEPC (820 µL, 1,5 eq.), e DIEA (1,2 ml) foram diluídos com diclorometano (3 ml). Após 2 horas (h) à temperatura ambiente (cerca de 28 graus Centígrados), a mistura de reação foi diluída com diclorometano (20 ml), lavada sucessivamente com NaHCO₃ aquoso (aq.) saturado (2x10 ml), NaCl saturado aq. (2 x 10 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi novamente suspenso em acetato de etilo e foi purificado através de cromatografia de fulgor em acetato de etilo. As frações

relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar o dipéptido como um sólido branco: 684 mg (46 %). ES-MS m/z 491,3 [M+H]⁺.

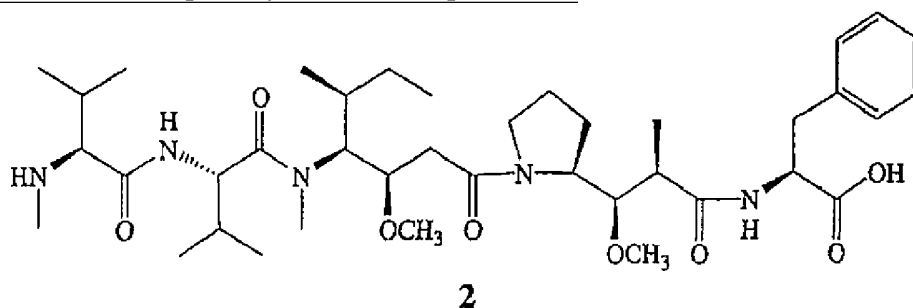
Para clivagem seletiva de Boc na presença de éster t-butílico, o dipéptido acima (500 mg, 1,28 mmol) foi diluído com dioxano (2 ml). 4M HCl/dioxano (960 µL, 3 eq.) foi adicionado, e a mistura de reação foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Desproteção quase completa de Boc foi observada por RP-HPLC com quantidade mínima de clivagem de éster t-butílico. A mistura foi arrefecida num banho de gelo, e trietilamina (500 µL) foi adicionado. Após 10 minutos, a mistura foi removida do banho de arrefecimento, diluída com diclorometano (20 ml), lavada sucessivamente com NaHCO₃ aquoso (aq.) saturado (2x10 ml), NaCl saturado aq. (2x10 ml). A camada orgânica foi concentrada para proporcionar uma espuma amarela: 287 mg (57 %). O intermediário foi usado sem purificação adicional.

O tripéptido Fmoc-Meval-val-dil-O-t-Bu (preparado conforme descrito no documento WO 02/088172, intitulado "*Pentapeptide Compounds and Uses Related Thereto*"; 0,73 mmol) foi tratado com TFA (3 ml), diclorometano (3 ml) durante 2 horas à temperatura ambiente. A mistura foi concentrada até secagem, o resíduo foi co-evaporado com tolueno (3 x 20 ml), e seca sob vácuo durante a noite. O resíduo foi diluído com diclorometano (5 ml) e adicionado ao dipéptido desprotegido (287 mg, 0,73 mmol), seguido por DIEA (550 µL, 4 eq.), DEPC (201 µL, 1,1 eq.). Após 2 horas à temperatura ambiente, a mistura de reação foi diluída com acetato de etilo (50 ml), lavada sucessivamente com ácido cítrico aq. a 10 % (2 x 20 ml), NaHCO₃ aq. saturado (2x10 ml), NaCl saturado aq. (2x10 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi novamente suspenso em acetato de etilo e foi purificado através de cromatografia de fulgor em acetato de etilo. As frações

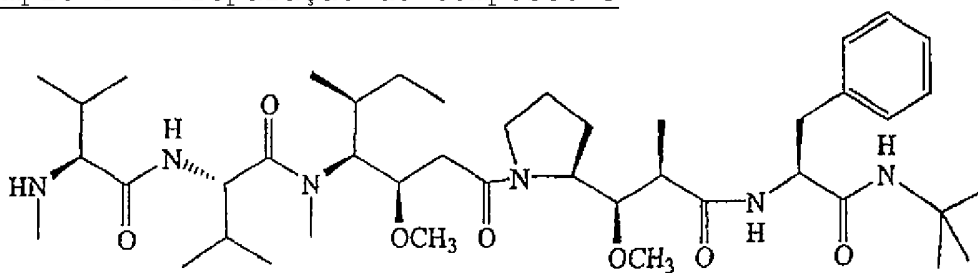
relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar Fmoc-Meval-val-dil-dap-phe-O-f-Bu como um sólido branco: 533 mg (71 %). R_f 0,4 (EtOAc). ES-MS m/z 1010,6 $[M+H]^+$.

O produto (200 mg, 0,2 mmol) foi diluído com diclorometano (3 ml), dietilamina (1 ml). A mistura de reação foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Solventes foram removidos para proporcionar um óleo que foi purificado por cromatografia de fulgor de sílica gel num gradiente de etapas 0-10 % de MeOH em diclorometano para proporcionar o Composto 1 como um sólido branco: 137 mg (87 %). R_f 0,3 (10 % de MeOH/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 788,6 $[M+H]^+$.

Exemplo 3 - Preparação do Composto 2



O Composto **2** foi preparado a partir do composto **1** (30 mg, 0,038 mmol) pelo tratamento com 4M HCl/dioxano (4 ml) durante 7 horas à temperatura ambiente. O solvente foi removido, e o resíduo foi seco sob vácuo durante a noite para proporcionar o Composto **2** como um sólido branco hidróscopico: 35 mg (120 % calculado para sal HCl). ES-MS m/z 732,56 $[M+H]^+$.

Exemplo 4 - Preparação do Composto 3**3**

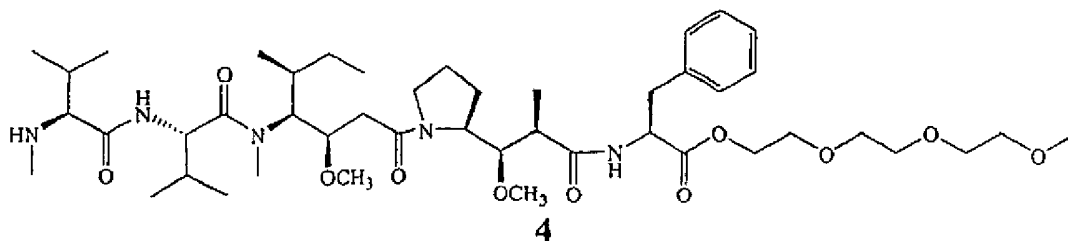
Fmoc-Meval-val-dil-dap-phe-O-f-Bu (Exemplo 2, 50 mg) foi tratado com 4M HCl/dioxano (4 ml) durante 16 horas à temperatura ambiente. O solvente foi removido, e o resíduo foi seco sob vácuo durante a noite para proporcionar 50 mg de um intermediário sólido branco hidroscópico.

O intermediário sólido branco (20 mg, 0,02 mmol) foi diluído com diclorometano (1 ml); DEPC (5 µL, 0,03 mmol, 1,5 eq.) foi adicionado seguido por DIEA (11 µL, 0,06 mmol, 3 eq.), e t-butilamina (3,2 µL, 0,03 mmol 1,5 eq.). Após 2 horas à temperatura ambiente, a reação ainda não estava completa de acordo com RP-HPLC. Mais DEPC (10 µL) e t-butilamina (5 µL) foram adicionados e a reação foi agitada por mais 4 horas. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (15 ml), lavada sucessivamente com água (5 ml), 0,1 M HCl aq. (10 ml), NaCl aq. saturado (10 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi diluído com diclorometano e purificado através de cromatografia de fulgor num gradiente de etapas 0-5 % de MeOH em diclorometano. As frações relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar o intermediário de Fmoc protegido como um sólido branco: 7,3 mg (36 %). R_f 0,75 (10 % de MeOH/CH₂Cl₂).

O intermediário de Fmoc protegido foi diluído com diclorometano (0,5 ml) e tratado com dietilamina (0,5 ml) durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada até a secagem. O produto foi isolado por

cromatografia de fulgor de sílica gel num gradiente de etapas de 0-10 % de MeOH em diclorometano para proporcionar o Composto 3 como um sólido branco: 4 mg (70 %). R_f 0,2 (10 % MeOH/CH₂Cl₂). ES-MS m/z 787 [M+H]⁺, 809 [M+Na]⁺.

Exemplo 5 - Preparação do Composto 4



Boc-L-Fenilalanina (265 mg, 1 mmol, 1 eq.) e trietilenoglicol monometil éter (164 μ L, 1 mmol, 1 eq.) foram diluídos com diclorometano (5 ml). Então, DCC (412 mg, 2 mmol, 2 eq.) foi adicionado, seguido por DMAP (10 mg). A mistura de reação foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. O precipitado foi filtrado. O solvente foi removido sob vácuo, o resíduo foi diluído com acetato de etilo, e purificado por cromatografia de fulgor de sílica gel em acetato de etilo. As frações contendo produto foram retiradas, concentradas, e secas em vácuo para proporcionar um sólido branco: 377 mg (91 %). R_f 0,5 (EtOAc). ES-MS m/z 434 [M+Na]⁺.

A remoção do grupo de proteção Boc foi executada pelo tratamento do material acima em dioxano (10 ml) com 4M HCl/dioxano (6 ml) durante 6 horas à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob vácuo, o resíduo foi seco em vácuo para proporcionar um sólido branco.

O sal HCl de fenilalanina-trietilenoglicol monometil éter éster (236 mg, 0,458 mmol, 1 eq.) e *N*-Boc-Dolaproína (158 mg, 0,55 mmol, 1,2 eq.) foram diluídos com diclorometano (3 ml). DEPC (125 μ L, 1,5 eq.) (SIC) e adicionado à mistura seguido por DIEA (250 μ L, 3 eq.). Após 2 horas à temperatura ambiente a mistura de reação foi diluída com acetato de etilo (30 ml), lavada sucessivamente com NaHCO₃ aq. saturado (2x10 ml), ácido cítrico aq. a 10 %

(2x10 ml), NaCl saturado aq. (2x10 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi novamente suspenso em acetato de etilo e foi purificado através de cromatografia de fulgor de sílica gel em acetato de etilo. As frações relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar um intermediário de espuma branca: 131 mg (50 %). R_f 0,25 (EtOAc). ES-MS m/z 581,3 $[M+H]^+$.

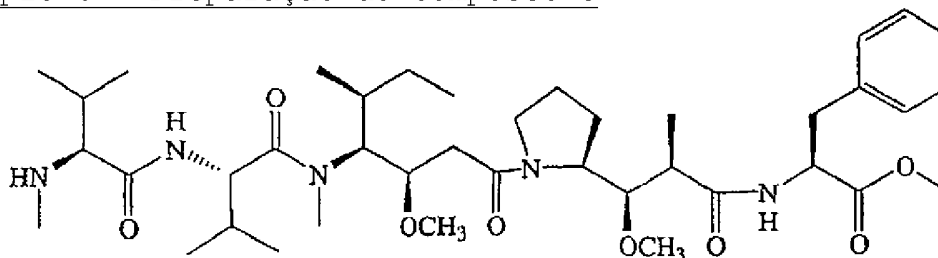
A desproteção de Boc foi efetuada em diclorometano (2 ml), TFA (0,5 ml) à temperatura ambiente durante 2 horas. Solvente foi removido sob vácuo, e o resíduo foi co-evaporado com tolueno (3 x 25 ml), então seco em vácuo para proporcionar 138 mg de sal de dipéptido TFA.

Fmoc-Meval-val-dil-OH (Exemplo 2, 147 mg, 0,23 mmol, 1 eq.) e sal de dipéptido TFA (138 mg) foram diluídos com diclorometano (2 ml). À mistura foi adicionado DEPC (63 μ L, 1,5 eq.), seguido por DIEA (160 μ L, 4 eq.). Após 2 horas à temperatura ambiente, a mistura de reação foi diluído com diclorometano (30 ml), lavada sucessivamente com ácido cítrico aq. a 10 % (2 x 20 ml), NaCl aq. saturado (20 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi suspenso novamente em diclorometano e foi purificado através de cromatografia de fulgor em sílica gel num gradiente de etapa de 0-5 % de MeOH em diclorometano. As frações relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar uma espuma branca: 205 mg (81 %). R_f 0,4 (10 % de MeOH/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 1100,6 $[M+H]^+$, 1122,4 $[M+Na]^+$.

O grupo protetor Fmoc foi removido por tratamento com dietilamina (2 ml) em diclorometano (6 ml). Após 6 horas a temperatura ambiente, solvente foi removido sob vácuo, o produto foi isolado por cromatografia de fulgor em sílica gel num gradiente de etapa de 0-5 % de MeOH em diclorometano. As frações relevantes foram combinadas e concentradas. Após evaporação de diclorometano/hexano, 1:1, o Composto 4 foi obtido como uma espuma branca: 133 mg

(80 %). R_f 0,15 (10 % de MeOH/CH₂Cl₂). ES-MS m/z 878,6 [M+H]⁺.

Exemplo 6 - Preparação do Composto 5

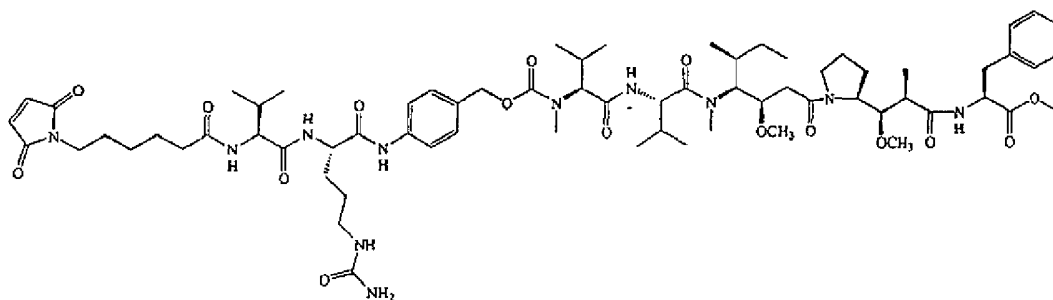


5

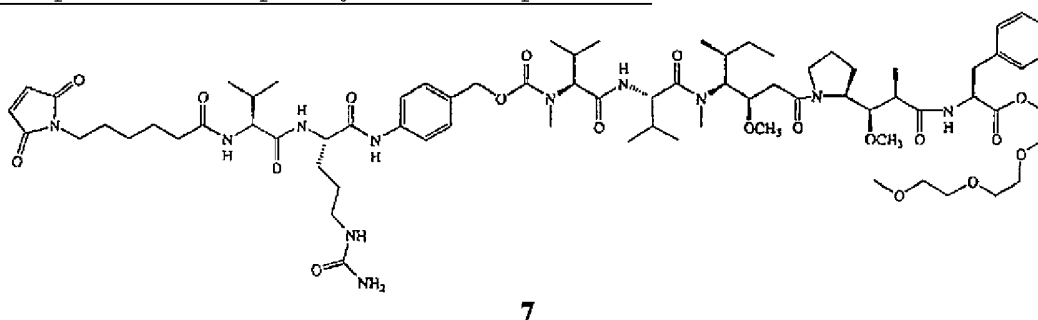
Fmoc-Meval-val-dil-OH (Exemplo 2, 0,50 g, 0,78 mmol) e dap- phe-OMe HCl (0,3 g, 0,78 mmol, preparado de acordo com Pettit, G.R., *et al.* Anti-Cancer Drug Design 1998, 13, 243-277) foram dissolvidos em CH₂Cl₂ (10 ml) seguido pela adição de diisopropiletilamina (0,30 ml, 1,71 mmol, 2,2 eq.). DEPC (0,20 ml, 1,17, 1,5 eq.) foi adicionado e o conteúdo permaneceu sob Ar. A reação estava completa em 1 hora de acordo com HPLC. A mistura foi concentrada num óleo e purificada por cromatografia de SiO₂ (coluna 300 x 25 mm) e eluída com EtOAc a 100 %. O produto foi isolado como um sólido espumoso branco: 0,65 g (87 %). ES-MS m/z 968,35 [M+H], 991,34 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215, 265 nm.

O péptido protegido com Fmoc (0,14 g, 0,14 mmol) em cloreto de metileno (5 ml) foi tratado com dietilamina (2 ml) e o conteúdo foi mantido à temperatura ambiente durante 2 horas. A reação, completa de acordo com HPLC, foi concentrada num óleo, colocada em 2 ml de DMSO e injetada num HPLC preparativo (coluna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente linear de MeCN em água (contendo 0,1 % de TFA) de 10 a 100 % em 40 minutos, seguido por 20 minutos a 100 %, numa taxa de fluxo de 25 ml/minuto). Frações contendo o produto foram evaporadas para suportar um pó branco para o sal de trifluoroacetato. Rendimento: 0,126 g (98 %). R_f 0,28 (100 % EtOAc). ES-MS m/z 746,59 [M+H]⁺, 768, 51 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215 nm.

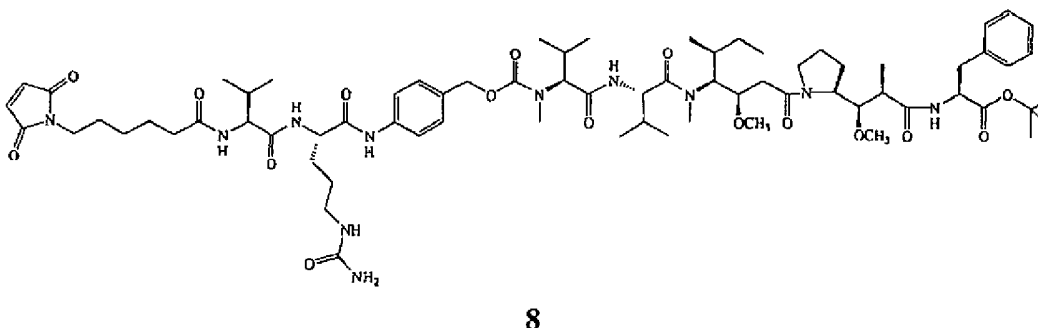
Exemplo 7 - Preparação do Composto 6

**6**

O sal de trifluoroacetato do Composto 5 (0,11 g, 0,13 mmol), composto **AB** (0,103 g, 0,14 mmol, 1,1 eq.) e HOBT (3,4 mg, 26 μ mol, 0,2 eq.) foram suspensos em DMF/piridina (2 ml/0,5 ml, respetivamente). Diisopropiletilamina (22,5 μ L, 0,13 mmol, 1,0 eq.) foi adicionado e a solução amarela foi agitada enquanto mantida sob árgon. Após 3 horas, 1,0 eq. adicional de DIEA foi adicionado. 24 horas mais tarde, 0,5 eq. do ligante ativado foi incluído na mistura de reação. Após um total de 40 horas, a reação estava completa. O conteúdo foi evaporado, colocado em DMSO e injetado em HPLC preparatória (coluna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente linear de MeCN em água (contendo 0,1 % de TFA) de 10 a 100 % em 40 minutos, seguido por 20 minutos a 100 %, numa taxa de fluxo de 50 ml/minuto). As frações desejadas foram evaporadas para proporcionar o produto como um óleo amarelo. Cloreto de metileno (ca. 2 ml) e éter em excesso foram adicionados para proporcionar o Composto **6** como um precipitado branco que foi filtrado e seco. Rendimento: 90 mg (52 %). ES-MS m/z 1344,32 [M+H]⁺, 1366,29 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215, 248 nm.

Exemplo 8 - Preparação do Composto 7

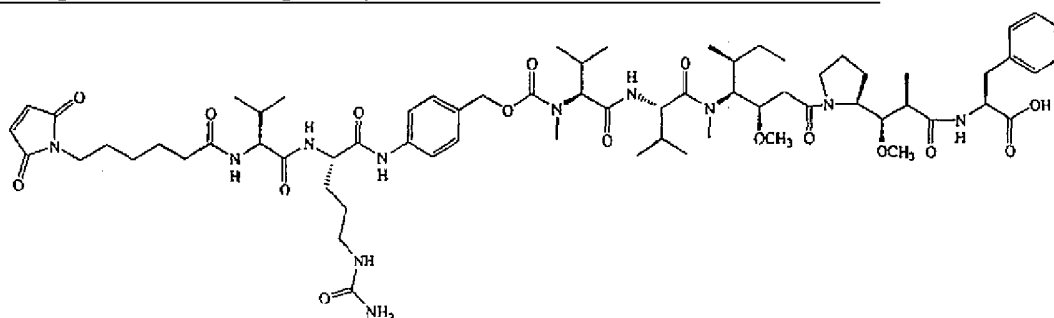
O Composto **4** (133 mg, 0,15 mmol, 1 eq.), Composto **AB** (123 mg, 0,167 mmol, 1,1 eq.), e HOBT (4 mg, 0,2 eq.) foram diluídos com DMF (1,5 ml). Após 2 minutos, piridina (5 ml) foi adicionada e a reação foi monitorizada usando RP-HPLC. A reação estava completa dentro de 18 horas. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (20 ml), lavada sucessivamente com 10 % de ácido cítrico (2x10 ml), água (10 ml), NaCl aq. saturado (10 ml). A camada orgânica foi separada e concentrada. O resíduo resultante foi suspenso novamente em diclorometano e foi purificado através de cromatografia de fulgor em sílica gel com um gradiente de etapas de 0-10 % de MeOH em diclorometano. As frações relevantes foram combinadas e concentradas para proporcionar o Composto 7 como uma espuma branca: 46 mg (21 %). R_f 0,15 (10 % de MeOH/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 1476,94 $[M+H]^+$.

Exemplo 9 - Preparação de éster t-butílico de MC-Val-Cit-PAB-MMAF **8**

O Composto **1** (83 mg, 0,11 mmol), Composto **AB** (85 mg, 0,12 mmol, 1,1 eq.), e HOBT (2,8 mg, 21 μ mol, 0,2 eq.)

foram colocados em DMF seco (1,5 ml) e piridina (0,3 ml) enquanto mantidos sob árgon. Após 30 horas, a reação estava essencialmente completa de acordo com HPLC. A mistura foi evaporada, colocada numa quantidade mínima de DMSO e purificada por HPLC preparatória (coluna C₁₂-RP, 5 µ, 100 Å, gradiente linear de MeCN em água (contendo 0,1 % de TFA) de 10 a 100 % em 40 minutos, seguido por 20 minutos a 100 %, numa taxa de fluxo de 25 ml/minuto) para proporcionar o Composto **8** como um sólido branco. Rendimento: 103 mg (71 %). ES- MS m/z 1387,06 [M+H]⁺, 1409,04 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 205, 248 nm.

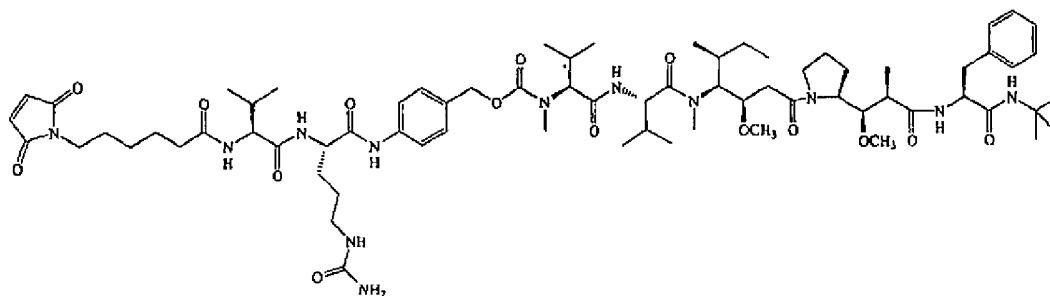
Exemplo 10 - Preparação de MC-Val-Cit-PAB-MMAF **9**



9

O Composto **8** (45 mg, 32 µmol) foi suspenso em cloreto de metileno (6 ml) seguido pela adição de TFA (3 ml). A solução resultante descansou durante 2 horas, a mistura de reação foi concentrada sob vácuo e purificada por HPLC preparatória (coluna C₁₂-RP, 5 µ, 100 Å, gradiente linear de MeCN em água (contendo 0,1 % de TFA) de 10 a 100 % em 40 minutos, seguido por 20 minutos a 100 %, numa taxa de fluxo de 25 ml/minuto). As frações desejadas foram concentradas para proporcionar maleimidocaproil-valina- citrulina-p-hidroximetilaminobenzeno-MMAF (MC-val-cit-PAB-MMAF) **9** como um sólido esbranquiçado. Rendimento: 11 mg (25 %). ES-MS m/z 1330,29 [M+H]⁺, 1352,24 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 205, 248 nm.

Exemplo 11 - Preparação de terc-butil amida de MC-Val-Cit-PAB-MMAF **10**

**10**

O Composto **3** (217 mg, 0,276 mmol, 1,0 eq.), Composto **AB** (204 mg, 0,276 mmol, 1,0 eq.), e HOBt (11 mg, 0,0828 mmol, 0,3 eq.) foram diluídos com piridina/DMF (6 ml). À esta mistura foi adicionado DIEA (0,048 ml), e a mistura foi agitada durante 16 horas. Orgânicos voláteis foram evaporados sob vácuo. O resíduo bruto foi purificado por Chromatotron® (cromatografia de camada final radial) com um gradiente de etapas (0-5 metanol a 10 % em DCM) para proporcionar terc-butil amida de MC-val-cit-PAB-MMAF **10**. Rendimento: 172 mg (45 %); ES-MS m/z 1386,33 $[M+H]^+$, 1408,36 $[M+Na]^+$; UV λ_{max} 215, 248 nm.

Exemplo 12 - Preparação de AC10-MC-MMAE pela Conjugação de AC10 e MC-MMAE

AC10, dissolvido em 500 mM de borato de sódio e 500 mM de cloreto de sódio a um pH de 8,0, é tratado com um excesso de 100 mM de ditionotrieto (DTT). Após incubação a 37 °C durante cerca de 30 minutos, o tampão é trocado por eluição sobre resina Sephadex G25 e eluído com PBS com 1 mM DTPA. O valor de tiol/Ab é verificado por determinação da concentração de anticorpo reduzido da absorvância a 280 nm da solução e a concentração de tiol pela reação com DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) e determinação da absorvância a 412 nm. O anticorpo reduzido dissolvido em PBS é arrefecido em gelo.

O reagente de fármaco ligante, maleimidocaproilmonometil auristatina E, isto é, MC-MMAE, dissolvido em

DMSO, é diluído em acetonitrilo e água em concentração conhecida, e adicionado ao anticorpo reduzido arrefecido AC10 em PBS. Após aproximadamente uma hora, um excesso de maleimida é adicionado para resfriar rapidamente a reação e capear quaisquer grupos tióis de anticorpo não feito reagir. A mistura de reação é concentrada por ultrafiltração centrífuga e AC10-MC-MMAE é purificado e dessalinizado por eluição através de resina G25 em PBS, filtrado através de filtros de 0,2 µm sob condições estéreis, e congelado para armazenagem.

Exemplo 13 - Preparação de AC10-MC-MMAE pela conjugação de AC10 e MC-MMAF

AC10-MC-MMAF foi preparado pela conjugação de AC10 e MC-MMAF seguindo o procedimento do Exemplo 12.

Exemplo 14 - Preparação de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE pela conjugação de AC10 e MC-val-cit-PAB-MMAE

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE foi preparado pela conjugação de AC10 e MC-val-cit-PAB-MMAE seguindo o procedimento do Exemplo 12.

Exemplo 15 - Preparação de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF pela conjugação de AC10 e MC-val-cit-PAB-MMAF (9)

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF foi preparado pela conjugação de AC10 e MC-val-cit-PAB-MMAF (9) seguindo o procedimento do Exemplo 12.

Exemplo 16 - Determinação de citotoxicidade de compostos selecionados

A atividade citotóxica de MMAF e dos Compostos **1-5** foi avaliada nas linhas celulares positiva Lewis Y OVCAR-3, carcinoma de mama H3396, carcinoma de pulmão L2987 e linhas celulares positiva Lewis Y de carcinoma de cólon LS174t podem ser analisadas quanto à toxicidade. Para avaliar a citotoxicidade dos Compostos **1-5**, as células podem ser semeadas a cerca de 5 - 10.000 por poço em 150 µl de meio de cultura então tratadas com doses graduadas dos Compostos **1-5** em quadruplicatas no início do ensaio. Os ensaios de

citotoxicidade são usualmente executados durante 96 horas após a adição dos compostos de teste. Cinquenta µl de corante resazurina podem ser adicionados a cada poço durante as últimas 4 a 6 horas da incubação para avaliar as células viáveis ao final da cultura. A redução do corante pode ser determinada por espectrometria de fluorescência usando a excitação e emissão de comprimentos de onda de 535 nm e 590 nm, respectivamente. Para análise, a extensão de redução de resazurina pelas células tratadas pode ser comparada àquela das células de controlo não tratadas.

Para ensaios de exposição de 1 hora, as células podem ser pulsadas com o fármaco durante 1 hora e então lavadas; o efeito citotóxico pode ser determinado após 96 horas de incubação.

EXEMPLO 17 - dados de citotoxicidade *in vitro* para compostos selecionados

O Quadro 10 mostra o efeito citotóxico de Conjugados de cAC10 dos Compostos **7-10**, analisados como descrito no Procedimento Geral I numa linha celular CD30+ Karpas 299. Os dados de duas experiências separadas são apresentados. Os conjugados de cAC10 dos Compostos **7** e **9** tiveram resultados ligeiramente mais ativos que cAC10-val-cit-MMAE.

QUADRO 10

Conjugado	IC ₅₀ (ng/ml)
cAC10-val-cit-MMAE	6
cAC10- 7	1,0
cAC10- 8	15
cAC10- 9	0,5
cAC10- 10	20

Em outras experiências, BR96-val-cit-MMAF foi pelo menos 250 vezes mais potente que o MMAF livre.

Procedimento Geral I - Determinação de citotoxicidade.

Para avaliar a citotoxicidade dos Conjugados Exemplares **7-10**, as células foram semeadas a cerca de 5 - 10.000 por

poço em 150 µl de meio de cultura, então tratadas com doses graduadas de Conjugados Exemplares **7-10** em quadruplicatas no início do ensaio. Análises de citotoxicidade foram executadas durante 96 horas após a adição dos compostos de teste. Cinquenta µl do corante resazurina foram adicionados a cada poço durante as últimas 4 a 6 horas da incubação para avaliar as células viáveis no final da cultura. A redução de corante foi determinada por espectrometria de fluorescência usando a excitação e emissão dos comprimentos de onda de 535 nm e 590 nm, respectivamente. Para análise, a extensão de redução de resazurina pelas células tratadas foi comparada àquela das células de controlo não tratadas.

Exemplo 18 - ensaio de proliferação celular in vitro

A eficácia de ADC pode ser medida por um ensaio de proliferação celular utilizando o protocolo a seguir (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza *et al.* (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

1. Uma alíquota de 100 µl de cultura de célula contendo cerca de 10^4 células (SKBR-3, BT474, MCF7 ou MDA-MB-468) no meio foi depositada em cada poço de uma lâmina de parede opaca de 96 poços.
2. Poços de controlo foram preparados contendo meio e sem células.
3. ADC foi adicionado aos poços experimentais e incubado durante 3-5 dias.
4. As lâminas foram equilibradas à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos.
5. Um volume de Reagente CellTiter-Glo igual ao volume de meio de cultura de célula presente em cada poço foi adicionado.
6. O conteúdo foi misturado durante 2 minutos num agitador orbital para induzir a luminescência das células.
7. A lâmina foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar o sinal de luminescência.

8. A luminescência foi registada e relatada em gráficos como ULR = unidades de luminescência relativa.

Exemplo 19 - Depuração plasmática em ratos

A farmacocinética de depuração plasmática de conjugados de anticorpo-fármaco e anticorpo total foi estudada em ratos Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, 250-275 g cada). Os animais foram dosados por bolo de injeção da veia da cauda (IV Push). Aproximadamente 300 µl de sangue total foi colhido através da cânula jugular, ou alfinetada na cauda, em recipientes de anticoagulante de lítio/heparina em cada ponto no tempo: 0 (pré-dose), 10 e 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 e 36 horas; e 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 dias após a dose. O anticorpo total foi medido por ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. Conjugado de anticorpo-fármaco foi medido por ELISA - MMAE/MMAF/ECD-Bio/SA-HRP.

Exemplo 20 - Depuração plasmática em macaco

A farmacocinética de depuração plasmática de conjugados de anticorpo-fármaco e anticorpo total pode ser estudada em macacos Cynomolgus. A Figura 12 mostra um estudo de depuração da concentração plasmática de dois estágios após administração de H-MC-vc-MMAE a macacos Cynomolgus em doses diferentes: 0,5, 1,5, 2,5, e 3,0 mg/kg, administrada no dia 1 e dia 21. Concentrações de anticorpo total e ADC foram medidas periodicamente. (H = Trastuzumab).

Exemplo 21 - Eficácia *in vivo* de volume tumoral em explantes de ratinhos transgênicos

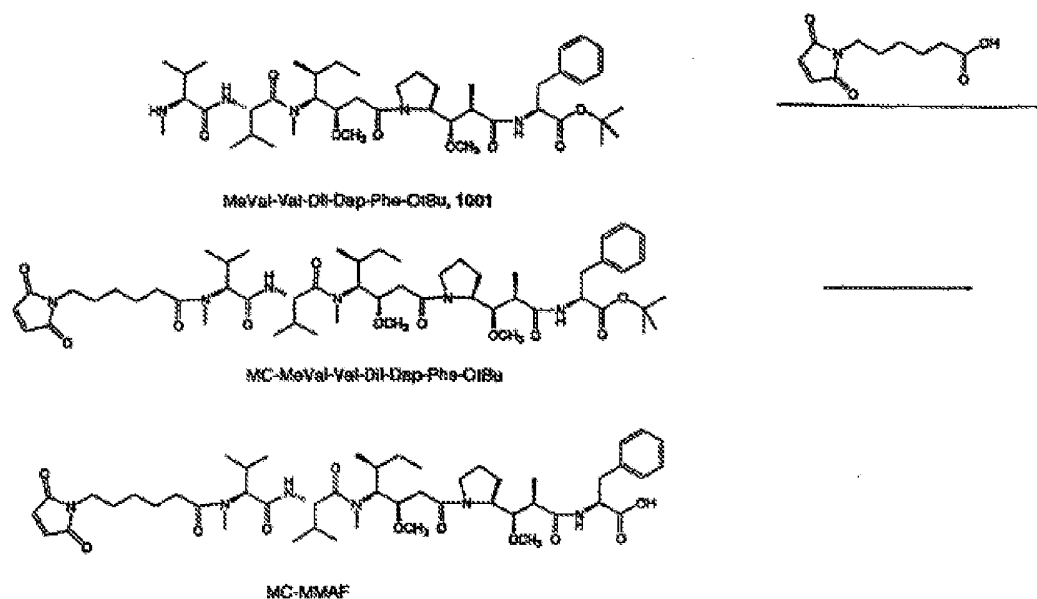
Animais adequados para experiências transgênicos podem ser obtidos de fontes comerciais padrões tais como Taconic (Germantown, N.Y.). Muitas estirpes são adequadas, mas ratinhos FVB fêmeas são preferidos devido a sua alta suscetibilidade à formação de tumor. FVB machos podem ser usados para acasalamento e machos CD.1 vasectomizados podem ser usados para estimular pseudogravidez. Ratinhos vasectomizados podem ser obtidos de qualquer fornecedor

comercial. Fundadores podem ser criados tanto com ratinhos FVB quanto com ratinhos 129/BL6 x FVB p53 heterozigóticos. Os ratinhos com heterozigosidade no alelo p53 podem ser usados para aumentar potencialmente a formação de tumor. Alguns tumores F1 são de estirpe mista. Tumores primários podem ser apenas FVB.

Animais que têm tumores (aloenxerto propagado de ratinho transgênico Fo5 mmtv) podem ser tratados com uma dose única ou múltipla por injeção IV de ADC. O volume do tumor pode ser avaliado em vários pontos no tempo após a injeção.

Exemplo 22 - Síntese de MC-MMAF via éster t-butílico

Síntese 1:



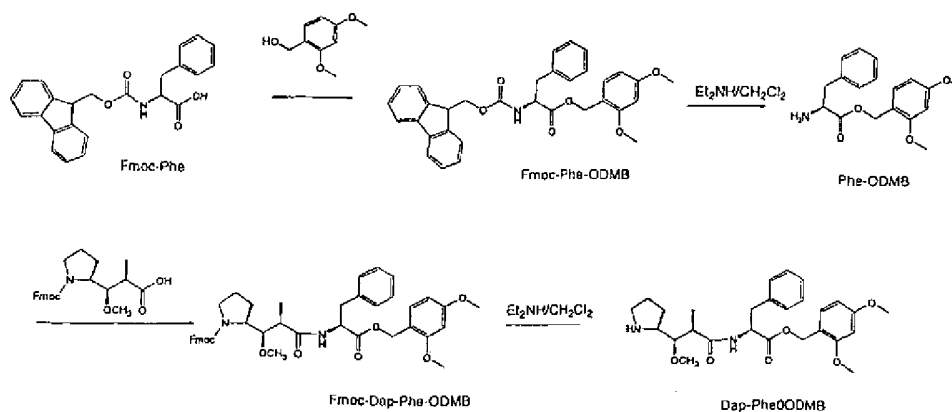
MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (composto **1**, 128,6 mg, 0,163 mmol) foi suspenso em CH_2Cl_2 (0,500 ml). Ácido 6-maleimidocaproico (68,9 mg, 0,326 mmol) e 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,0505 ml, 0,326 mmol) foram adicionados seguido por piridina (0,500 ml). A mistura de reação foi deixada agitar durante 1,0 hora. Análise por HPLC indicou consumo completo do composto **1** de partida. Orgânicos voláteis foram evaporados sob pressão reduzida. O produto foi isolado através de cromatografia de fulgor de

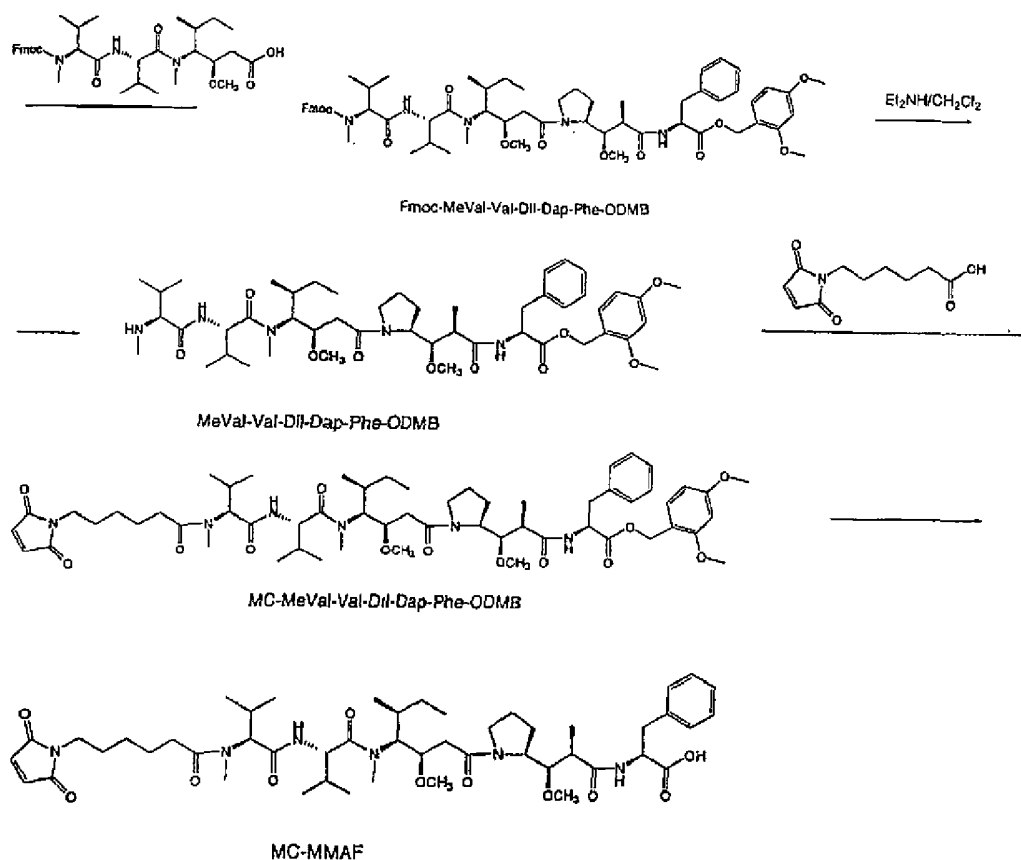
coluna, usando um gradiente de etapa de 0 a 5 % de Metanol em CH_2Cl_2 . Um total de 96 mg de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (12) puro (60 % de rendimento) foi recuperado. ES-MS m/z 981,26 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1003,47 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 979,65 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Composto 12, 74 mg, 0,0754 mmol) foi suspenso em CH_2Cl_2 (2,0 ml) e TFA (1 ml) à temperatura ambiente. Após 2,5 horas, análise de HPLC indicou consumo completo do material de partida. Orgânicos voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o produto foi isolado através de RP-HPLC preparatória, usando uma Coluna Phenomenex C_{12} Synergi Max-RP 80Å (250 x 21,2 mm). Eluente: gradiente linear 10 % a 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq.) durante 30 minutos, então 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) isocrático durante mais 20 minutos. ES-MS m/z 925,33 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 947,30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 923,45 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Exemplo 23a - Síntese de MC-MMAF (11) via éster dimetoxibenzílico

Síntese 2:





Preparação de éster Fmoc-L-Fenilalanina-2,4-dimetoxibenzílico (Fmoc-Phe-ODMB)

Um balão de fundo redondo de 5 L, 3 gargalos, foi carregado com Fmoc-L-fenilalanina (200 g, 516 mmol Bachem), álcool 2,4-dimetoxibenzílico (95,4 g, 567 mmol, Aldrich), e CH_2Cl_2 (2,0 L). N,N-dimetilformamida t-butil acetal (155 ml, 586 mmol, Fluka) foi adicionado à suspensão resultante durante 20 minutos sob N_2 , o que resultou numa solução límpida. A reação foi, então, agitada à temperatura ambiente durante a noite, e após este período de tempo análise TLC (0,42, Heptano/EtOAc = 2:1) indicou que a reação estava completa. A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida para proporcionar um óleo amarelo claro, que foi redissolvido em CH_2Cl_2 (200 ml) e purificado através de um plugue curto de sílica gel (25 cm x 25 cm, CH_2Cl_2) para proporcionar uma espuma incolor (250 g). MeCN

(1 L) foi adicionado na espuma resultante, que dissolveu totalmente o lote. Ela foi então concentrada até secagem e redissolvida em MeCN (1 L) e a suspensão resultante foi agitada durante 1 hora, filtrada e o bolo de filtração foi enxaguado com MeCN (2 x 200 ml) para proporcionar éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibenzílico como um sólido branco (113,58 g, 41 %, 95,5 % AUC por análise de HPLC). Dados: HPLC.

Preparação de éster L-fenilalanina-2,4-dimetoxibenzílico (Phe-ODMB).

Um balão de fundo redondo de 500 ml foi carregado com éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibenzílico (26,00 g, 48,3 mmol), CH₂Cl₂ (150 ml) e dietilamina (75 ml, Acros). A mistura foi agitada à temperatura ambiente e o término foi monitorizado por HPLC. Após 4 horas, a mistura foi concentrada (temperatura do banho < 30 °C). O resíduo foi novamente suspenso em CH₂Cl₂ (20 ml), e concentrado. Isso foi repetido mais uma vez. Ao resíduo foi adicionado MeOH (20 ml), o que causou a formação de um gel. Este resíduo foi diluído com CH₂Cl₂ (200 ml), concentrado e o óleo turvo foi deixado sob vácuo durante a noite. O resíduo foi suspenso em CH₂Cl₂ (100 ml), então tolueno (120 ml) foi adicionado. A mistura foi concentrada e o resíduo foi deixado sob vácuo durante a noite.

Dados: HPLC, ¹H RMN.

Preparação de Fmoc-Dolaproína (Fmoc-Dap)

Boc-Dolaproína (58,8 g, 0,205 mol) foi suspenso em 4 N HCl em 1,4-dioxano (256 ml, 1,02 mol, Aldrich). Após agitação durante 1,5 horas, análise de TLC indicou que a reação estava completa (10 % de MeOH/CH₂Cl₂) e a mistura foi concentrada até secagem quase completa. 1,4-dioxano adicional foi carregado (50 ml) e a mistura foi concentrada até secagem e seca sob vácuo durante a noite. O sólido branco resultante foi dissolvido em H₂O (400 ml) e transferido para um balão de fundo redondo, de 3 L, três

gargalos, com um agitador mecânico e sonda de temperatura. N,N-diisopropiletilamina (214,3 ml, 1,23 mol, Acros) foi adicionado durante um minuto, causando uma exoterma de 20,5 a 28,2 °C (interna). A mistura foi arrefecida num banho de gelo e 1,4-dioxano foi adicionado (400 ml). Uma solução de Fmoc-OSu (89,90 g, 0,267 mol, Advanced ChemTech) em 1,4-dioxano (400 ml) foi adicionada de um funil de adição durante 15 minutos, mantendo a temperatura de reação a seguir de 9 °C. A mistura foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante 19 horas, após o que a mistura foi concentrada por evaporação giratória até uma pasta aquosa (390 g). A suspensão foi diluída com H₂O (750 ml) e Et₂O (750 ml), causando a formação copiosa de um precipitado branco. As camadas foram separadas, mantendo os sólidos com a camada orgânica. A camada aquosa foi acidificada usando HCl concentrado (30 ml) e extraída com EtOAc (3 x 500 ml). Os extratos combinados foram secos com MgSO₄, filtrados e concentrados para proporcionar 59,25 g de um óleo amarelo A. O extrato de Et₂O foi extraído uma vez com "sat" (SIC). NaHCO₃ (200 ml), mantendo os sólidos com a camada aquosa. A suspensão aquosa foi acidificada usando HCl concentrado (50 ml) e extraída com Et₂O (50 ml), mantendo os sólidos com a camada orgânica. A camada orgânica foi filtrada e concentrada para proporcionar 32,33 g de um óleo amarelo B. Os dois óleos (A e B) foram combinados e purificados por cromatografia de fulgor em sílica gel eluindo com CH₂Cl₂ (3,5 L), então 3 % de MeOH/CH₂Cl₂ (9 L) para proporcionar 68,23 g de Fmoc-dolaproína como uma espuma branca (81 %, 97,5 % de pureza por HPLC (AUC)).

Preparação de Fmoc-Dap-Phe-ODMB

Phe-ODMB bruto (48,3 mmol) foi suspenso em DMF anidro (105 ml, Acros) durante 5 minutos e Fmoc-Dap (19,80 g, 48,3 mmol) foi adicionado. A mistura foi arrefecida num banho de gele e TBTU (17,08 g, 53,20 mmol, Matrix Innovations) foi

adicionado. N,N-diisopropiletilamina (25,3 ml, 145,0 mmol, Acros) foi adicionada através de seringa durante 3 minutos. Após 1 hora, o banho de gelo foi removido e a mistura foi deixada aquecer durante 30 minutos. A mistura foi colocada em água (1 L) e extraída com acetato de etilo (300 ml). Após separação, a camada aquosa foi novamente extraída com acetato de etilo (2 x 150 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (150 ml), secas (MgSO_4) e filtradas (filtro de papel) para remover os insolúveis (inorgânicos e um pouco de dibenzofulveno). Após concentração, o resíduo (41 g) foi absorvido em sílica (41 g) e purificado por cromatografia (coluna de 22 cm x 8 cm; 65 % de Heptano/EtOAc (2,5 L); 33 % de Heptano/EtOAc (3,8 L), para proporcionar 29,4 g de produto como uma espuma branca (86 %, 92 % de pureza por HPLC).

Dados: HPLC, ^1H RMN, TLC (1:1 EtOAc/Heptano R_f = 0,33, vermelho em coloração com vanilina).

Preparação de Dap-Phe-ODMB

Um balão de fundo redondo de 1 L foi carregado com Fmoc-Dap-Phe-ODMB (27,66 g), CH_2Cl_2 (122 ml) e dietilamina (61 ml, Acros). A solução foi agitada à temperatura ambiente e o término foi monitorizado por HPLC. Após 7 horas, a mistura foi concentrada (temperatura do banho < 30 °C). O resíduo foi suspenso em CH_2Cl_2 (300 ml) e concentrado. Isto foi repetido duas vezes. Ao resíduo foi adicionado MeOH (20 ml) e CH_2Cl_2 (300 ml), e a solução foi concentrada. O resíduo foi suspenso em CH_2Cl_2 (100 ml) e tolueno (400 ml), concentrado, e o resíduo foi deixado sob vácuo durante a noite para proporcionar um resíduo tipo creme.

Dados: HPLC, ^1H RMN, MS

Preparação de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Dap-Phe-ODMB bruto (39,1 mmol) foi suspenso em DMF anidro (135 ml, Acros) durante 5 minutos e Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (24,94 g, 39,1 mmol, veja-se Exemplo 2 para

preparação) foi adicionado. A mistura foi arrefecida num banho de gelo e TBTU (13,81 g, 43,0 mmol, Matrix Innovations) foi adicionado. N,N-diisopropiletilamina (20,5 ml, 117,3 mmol, Acros) foi adicionada através de seringa durante 2 minutos. Após 1 hora, o banho de gelo foi removido e a mistura foi deixada aquecer durante 30 minutos. A mistura foi colocada em água (1,5 L) e diluída com acetato de etilo (480 ml). Após descansar durante 15 minutos, as camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (300 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (200 ml), secas (MgSO_4) e filtradas (filtro de papel) para remover os insolúveis (inorgânicos e um pouco de dibenzofulveno). Após concentração, o resíduo (49 g) foi raspado do balão e absorvido em sílica (49 g) e purificado por cromatografia (coluna dia de 15 cm x 10 cm; 2:1 EtOAc/Heptano (3 L), EtOAc (5L); frações de 250 ml) para proporcionar 31,84 g de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB como uma espuma branca (73 %, 93 % de pureza por HPLC (AUC)).

Dados, HPLC, TLC (2:1 EtOAc/heptano, R_f = 0,21, vermelho em coloração com vanilina).

Preparação de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Um balão de fundo redondo de 1 litro foi carregado com Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (28,50 g), CH_2Cl_2 (80 ml) e dietilamina (40 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite e então foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi absorvido em sílica (30 g) e purificado por cromatografia de fulgor (coluna dia de 15 cm x 8 cm; 2 % de MeOH/DCM (2L), 3 % de MeOH/DCM (1 L), 6 % de MeOH/DCM (4 L); frações de 250 ml) para proporcionar 15,88 g de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB como uma espuma branca (69 %, 96 % de pureza por HPLC (AUC)).

Dados: HPLC, TLC (6 % de MeOH/DCM, R_f = 0,24, vermelho em coloração com vanilina).

Preparação de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

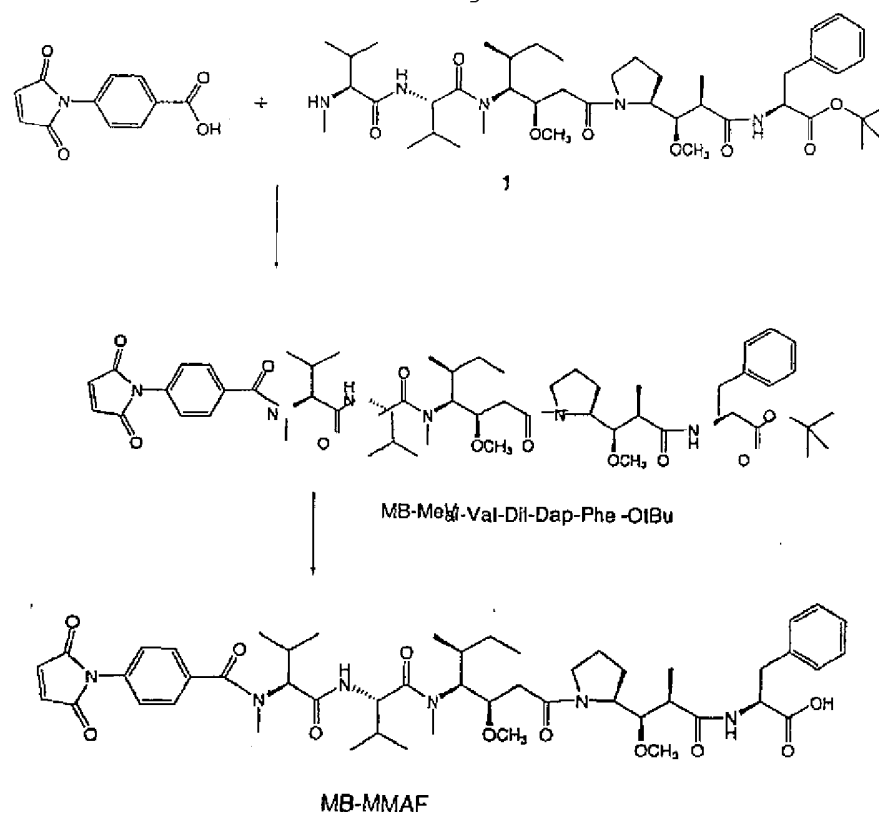
Um balão de fundo redondo, 50 ml, foi carregado com MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (850 mg, 0,85 mmol), DMF anidro (4 ml), ácido maleimidocaproico (180 mg, 0,85 mmol), e TBTU (300 mg, 0,93 mmol, Matrix Innovations) à temperatura ambiente. N,N-diisopropiletilamina (450 µL, 2,57 mmol) foi adicionado através de seringa. Após 1,5 horas, a mistura foi colocada em água (50 ml) e diluída com acetato de etilo (30 ml). NaCl foi adicionado para melhorar a separação. Após separação das camadas, a camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (25 ml). As camadas orgânicas combinadas foram secas (MgSO₄), filtradas e concentradas. O óleo resultante (1 g) foi purificado por cromatografia de fulgor [100 ml de sílica; 25 % de Heptano/EtOAc (100 ml), 10 % de Heptano/EtOAc (200 ml), EtOAc (1,5 L)] para proporcionar MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (13) como uma espuma branca (521 mg, 57 %, 94 % de pureza por HPLC (AUC)).

Dados: ¹H RMN, HPLC.

Preparação de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OH (MC-MMAF) (11)

Um balão de fundo redondo de 50 ml foi carregado com MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (Composto 13, 428 mg, 0,39 mmol) e dissolvido em 2,5 % de TFA/CH₂Cl₂ (20 ml). A solução tornou-se rosa-roxa durante 2 minutos. O término foi monitorizado por HPLC e TLC (6 % de MeOH/DCM, coloração com KMnO₄). Após 40 minutos, três gotas de água foram adicionadas e a mistura turva rosa-roxo foi concentrada para proporcionar 521 mg de um resíduo de cor rosa. Purificação por cromatografia (15 % IPA/DCM) proveu 270 mg de MC-MMAF (73 %, 92 % de pureza por HPLC) como um sólido branco.

Exemplo 23b - Síntese de análogo de mc-MMAF



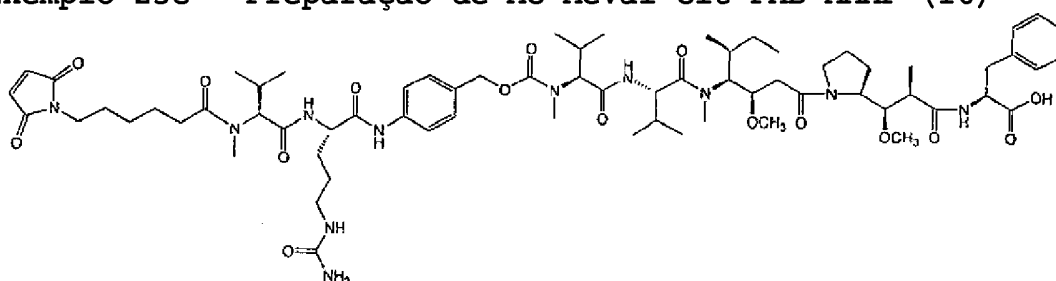
MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Composto 1, 35 mg, 0,044 mmol) foi suspenso em DMF (0,250 ml). Ácido 4-(2,5-Dioxo-2,5-diidro-pirrol-1-il)- benzoico (11 mg, 0,049 mmol) e HATU (17 mg, 0,044 mmol) foram adicionados, seguidos por DIEA (0,031 ml, 0,17 mmol). Esta mistura de reação foi deixada agitar durante 2,0 horas. Análise de HPLC indicou consumo completo do composto 1 de partida.

O produto foi isolado através de RP-HPLC preparatória, usando uma Coluna Phenomenex Ci₂ Synergi Max-RP 80 Å (250 x 21,20 mm). Eluente: gradiente linear 10 % a 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) durante 8 minutos, então 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) isocrático durante mais 12 minutos. Um total de 20 mg de produto puro (14) foi isolado (0,02 mmol, 46 % de rendimento). ES-MS m/z 987,85 [M+H]⁺, 1019,41 [M+Na]⁺; 985,54 [M-H]⁻.

MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Composto 14, 38 mg, 0,0385 mmol) foi suspenso em CH₂Cl₂ (1 ml) e TFA (1 ml). A

mistura foi agitada durante 2,0 horas, e então os orgânicos voláteis foram evaporados sob pressão reduzida. O produto foi purificado por RP-HPLC preparatória, usando uma Coluna Phenomenex C₁₂ Synergi Max-RP 80 Å (250 x 21,20 mm). Eluente: gradiente linear 10 % a 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) durante 8 minutos, então 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) isocrático durante mais 12 minutos. Um total de 14,4 mg de produto MB-MMAF foi isolado (0,015 mmol, 40 % de rendimento). ES-MS m/z 930,96 [M+H]⁺, 952,98 [M+Na]⁺; 929,37 [M-H]⁻.

Exemplo 23c - Preparação de MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16)



A uma suspensão à temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OH (3,03 g, 8,57 mmol) e carbonato de N,N'-dissuccimidilo (3,29 g, 12,86 mmol) em CH₂Cl₂ (80 ml) foi adicionado DIEA (4,48 ml, 25,71 mmol). Esta mistura de reação foi deixada agitar durante 3,0 horas, e então foi colocada num funil de separação onde a mistura orgânica foi extraída com 0,1 M HCl (aq). O resíduo orgânico bruto foi concentrado sob pressão reduzida, e o produto foi isolado por cromatografia de fulgor de coluna em sílica gel usando um gradiente linear de 20-100 % de acetato de etila/hexanos. Um total de 2,18 g de Fmoc-MeVal-OSu puro (4,80 mmol, 56 % de rendimento) foi recuperado.

A uma suspensão de Fmoc-MeVal-OSu (2,18 g, 4,84 mmol) em DME (13 ml) e THF (6,5 ml) à temperatura ambiente foi adicionada uma solução de L-citrulina (0,85, 4,84 mmol) e NaHCO₃ (0,41 g, 4,84 mmol) em H₂O (13 ml). A suspensão foi deixada agitar à temperatura ambiente durante 16 horas, então foi extraída em terc-BuOH/CHCl₃/H₂O, acidificada a um

pH = 2-3 com 1 M HCl. A fase orgânica foi separada, seca e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com dietil éter resultando em 2,01 g de Fmoc-MeVal-Cit-COOH que foi usado sem purificação adicional.

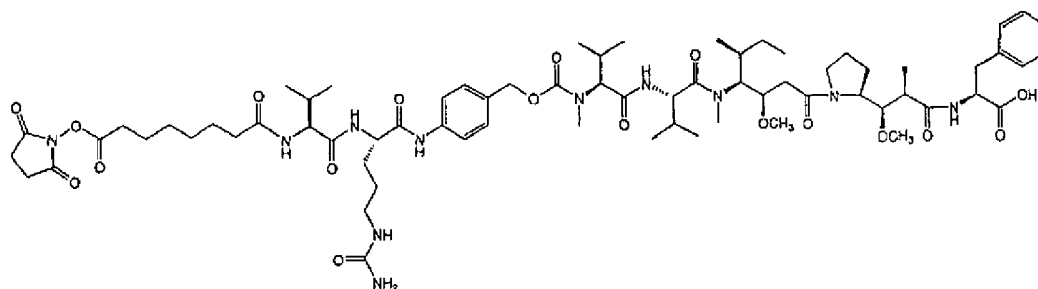
O Fmoc-MeVal-cit-COOH bruto foi suspenso em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ a 2:1 (100 ml), e a ele foi adicionado álcool p-aminobenzílico (0,97 g, 7,9 mmol) e EEDQ (1,95 g, 7,9 mmol). Esta suspensão foi deixada agitar durante 125 horas, então os orgânicos voláteis foram removidos sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de fulgor em sílica gel, usando 10 % de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH puro (0,55 g, 0,896 mmol, 18,5 % de rendimento) foi recuperado. ES-MS m/z 616,48 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

A uma suspensão de Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0,55 g, 0,896 mmol) em CH_2Cl_2 (40 ml) foi adicionado STRATOSPHERES™ (ligado a piperazina-resina) (> 5 mmol/g, 150 mg). Após ser agitada à temperatura ambiente durante 16 horas, a mistura foi filtrada através de celite (pré-lavada com MeOH), e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com dietil éter e hexanos. O material sólido resultante, MeVal-Cit-PAB-OH, foi suspenso em CH_2Cl_2 (20 ml), e a ele foi adicionado MC-OSu (0,28 g, 0,896 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,99 mmol), e DMF (15 ml). Esta suspensão foi agitada durante 16 horas, mas análise de HPLC da mistura de reação indicou reação incompleta, assim a suspensão foi concentrada sob pressão reduzida até um volume de 6 ml, então uma solução a 10 % de NaHCO_3 (aq) foi adicionada e a suspensão foi agitada por mais 16 horas. Solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de fulgor em sílica gel, usando um gradiente de 0-10 % de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, resultando em 42 mg (0,072 mmol, 8 % de rendimento) de MC-MeVal-Cit-PAB-OH.

A uma suspensão de MC-MeVal-Cit-PAB-OH (2,37 g, 4,04 mmol) e bis(nitrofenil)carbonato (2,59 g, 8,52 mmol) em CH_2Cl_2 (10 ml) foi adicionado DIEA (1,06 ml, 6,06 mmol).

Esta suspensão foi agitada durante 5,5 horas, concentrada sob pressão reduzida e purificada por trituração com dietil éter. MC-MeVal-Cit-PAB-OCO-pNP (147 mg, 0,196 mmol) foi suspensa numa solução de 1:5 de piridina/DMF (3 ml), e a isto foi adicionado HOBt (5 mg, 0,039 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,978 mmol) e MMAF (composto 2, 150 mg, 0,205 mmol). Esta mistura de reação foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente, e então purificada por RP-HPLC preparatória (x3), usando uma Coluna Phenomenex C₁₂ Synergi Max-RP 80 Å (250 x 21,20 mm). Eluente: gradiente linear 10 % a 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) durante 30 minutos, então 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (aq) isocrático durante mais 20 minutos. MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16) foi obtido como um sólido amarelado (24,5 mg, 0,0182, 0,45 % de rendimento). ES-MS m/z 1344,95 [M+H]⁺, 1366,94 [M+Na]⁺.

Exemplo 23d - Preparação de éster de succinimida de suberil Val-Cit-PAB-MMAF (17)



Composto 17

O composto **1** (300 mg, 0,38 mmol), Fmoc-Val-cit-PAB-pNP (436 mg, 0,57 mmol, 1,5 eq.) foram suspensos em piridina anidra, 5 ml. HOBt (10 mg, 0,076 mmol, 0,2 eq.) foi adicionado seguido por DIEA (199 µl, 1,14 mmol, 3 eq.). A mistura de reação foi exposta a ondas sonoras durante 10 minutos, e então foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Piridina foi removida sob pressão reduzida, o resíduo foi novamente suspenso em CH₂Cl₂. A mistura foi separada por cromatografia de fulgor de sílica gel num gradiente de etapa de MeOH, de 0 a 10 %, em CH₂Cl₂. As

frações contendo produto foram extraídas, concentradas, secas em vácuo durante a noite para proporcionar 317 mg (59 % de rendimento) de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu. ES-MS m/z 1415,8 [M+H]⁺.

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu (100 mg) foi agitado em 20 % de TFA/CH₂Cl₂ (10 ml), durante 2 horas. A mistura foi diluída com CH₂Cl₂ (50 ml). A camada orgânica foi lavada sucessivamente com água (2 x 30 ml) e salmoura (1 x 30 ml). A fase orgânica foi concentrada, carregada numa almofada de sílica gel em 10 % de MeOH/CH₂Cl₂. O produto foi eluído com 30 % de MeOH/CH₂Cl₂. Após secagem sob vácuo durante a noite, Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF foi obtido como um sólido branco, 38 mg, 40 % de rendimento. ES- MS m/z 1357,7 [M-H]⁻.

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, 67 mg, foi suspenso em CH₂Cl₂ (2 ml) dietilamina (2 ml) e DMF (2 ml). A mistura foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi co-evaporado com piridina (2 ml), então com tolueno (2x5 ml), seco sob vácuo. Val-Cit-PAB-MMAF foi obtido como um óleo amarronzado, e usado sem purificação adicional.

Todo Val-Cit-PAB-MMAF preparado de 67 mg de Fmoc-Val-cit-PAB-MMAF, foi suspenso em piridina (2 ml), e adicionado a uma solução de suberato de dissuccinimidilo (74 mg, 0,2 mmol, 4 eq.), em piridina (1 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente. Após 3 horas, éter (20 ml) foi adicionado. Precipitado foi colhido, lavado com uma quantidade adicional de éter. Um sólido avermelhado foi suspenso em 30 % de MeOH/ CH₂Cl₂, filtrado através de uma almofada de sílica gel com 30 % de MeOH/ CH₂Cl₂ como um eluente. O Composto **17** foi obtido como um sólido branco, 20 mg (29 % de rendimento). ES-MS m/z 1388,5 [M-H]⁻.

Exemplo 24 - Eficácia *In vivo* de Conjugados Anticorpo-Fármaco mcMMAF

Eficácia de cAC10-mcMMAF em xenoenxertos de Karpas-1299 ALCL: Para avaliar a eficácia *in vivo* de cAC10-mcMMAF com uma média de 4 frações de fármaco por anticorpo (cAC10-mcF4), células Karpas-299 humana ALCL foram implantadas subcutaneamente em ratinhos C.B-17 SCID imunodeficiente (5×10^6 células por ratinho). Os volumes de tumor foram calculados usando a fórmula ($0,5 \times L \times W^2$) onde L e W são as duas medições bidirecionais, mais longa e mais curta. Quando o volume médio do tumor nos animais do estudo atingiu cerca de 100 mm^3 (intervalo 48-162), os ratinhos foram divididos em 3 grupos (5 ratinhos por grupo) e foram tanto deixados sem tratamento quanto foram proporcionados com uma injeção intravenosa única através da veia da cauda com 1 ou 2 mg/kg cAC10-mcF4 (Figura 1). Os tumores nos ratinhos não tratados cresceram rapidamente até um volume médio de $> 1.000 \text{ mm}^3$ dentro de 7 dias do início da terapêutica. Em contraste, todos os tumores tratados com cAC10-mcF4 mostraram regressão rápida com 3/5 no grupo de 1 mg/kg e 5/5 no grupo de 2 mg/kg obtendo resposta completa do tumor. Embora o tumor num dos indivíduos totalmente respondedores no grupo de 2 mg/kg tenha recorrido cerca de 4 semanas mais tarde, não houve tumores detetáveis nos 4/5 das respostas remanescentes neste grupo e nos 3 casos de resposta completa no grupo de 1 mg/kg nas 10 semanas após a terapêutica.

Eficácia de cBR96-mcMMAF nos Xenoenxertos L2987 NSCLC: cBR96 é um anticorpo quimérico que reconhece o antígeno Le^y. Para avaliar a eficácia *in vivo* de cBR96-mcMMAF com 4 fármacos por anticorpo (cBR96-mcF4) fragmentos de tumor de cancro de pulmão de célula grande L2987 (NSCLC) foram implantadas em ratinho nu atímico. Quando os tumores atingiram uma média de cerca de 100 mm^3 , os ratinhos foram divididos em 3 grupos: grupo não tratado e 2 grupos de

terapêuticas. Para terapêutica, conforme mostrado na Figura 3a, os ratinhos receberam cBR96- mcF4 em doses de 3 ou 10 mg/kg/injeção cada 4 dias para um total de 4 injeções (q4dx4). Conforme mostrado na Figura 3b, cBR96-mcF4 ou um conjugado de controlo não ligando foi administrado aos ratinhos em injeções de 3 ou 10 mg/kg a cada 4 dias, num total de 4 injeções (q4dx4). Conforme mostrado nas Figuras 3a e 3 b, BR96-mcF4 produziu atraso pronunciado no crescimento do tumor se comparado aos controlos.

A Figura 2 mostra um ensaio de eficácia *in vivo*, de dose única de cAC10-mcMMAF em L540CY subcutaneamente. Para este estudo existiam 4 ratinhos no grupo sem tratamento e 10 em cada um dos grupos de tratamento.

Exemplo 25 - Eficácia *In vitro* de Conjugados de Anticorpo-Fármaco mc-MMAF

Atividade de conjugados de cAC10-anticorpo-fármaco contra linhas celulares CD30⁺. As Figuras 4a e 16b mostram curvas de resposta a dosagem de uma experiência representativa onde culturas de Karpas 299 (linfoma de célula grande anaplástico) e L428 (Linfoma de Hodgkin) foram incubadas com cAC10-mcMMAF diluído (Figura 4a) ou cAC-10-vcMMAF (Figura 4b) de forma serial durante 96 horas. As culturas foram marcadas durante 4 horas com 50 μ M de resazurina [10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona] e a fluorescência foi medida. Os dados foram reduzidos no GraphPad Prism, versão 4.000, usando o procedimento de ajuste de curva de dose - resposta de 4 de parâmetros. Os valores IC₅₀ são definidos como a concentração onde o crescimento é reduzido 50 % se comparado com culturas de controlo não tratadas. Cada concentração foi testada quatro vezes.

Atividade de conjugados de cBR96-anticorpo-fármaco contra linhas celulares Le^{y+}. As Figuras 5a e 5b mostram curvas de resposta de dose de uma experiência representativa onde culturas de H3396 (carcinoma de mama) e

L2987 (carcinoma de pulmão de célula grande) foram incubadas com cBR96-mcMMAF (Figura 5a) ou -vcMMAF (Figura 5b) diluídos de forma serial durante 96 horas. As culturas foram marcadas durante 4 horas com resazurina 50 μ M e a fluorescência foi medida. Os dados foram reduzidos no GraphPad Prism, versão 4.000, usando o procedimento de ajuste de 4-dose de parâmetro-curva de resposta. Os valores IC₅₀ são definidos como a concentração onde o crescimento é reduzido 50 % se comparado com culturas de controlo não tratadas. Cada concentração foi testada quatro vezes.

Atividade de conjugados de c1F6-anticorpo-fármaco contra linhas celulares de carcinoma de célula renal CD70⁺. As Figuras 6a e 6b mostram curvas de resposta-dose de uma experiência representativa onde culturas de células Caki-1 e 786-0 foram incubadas com c1F6-mcMMAF (Figura 6a) ou -vcMMAF (Figura 6b) diluídos de forma serial durante 96 horas. As culturas foram marcadas durante 4 horas com resazurina 50 μ M e a fluorescência foi medida. Os dados foram reduzidos no GraphPad Prism, versão 4.000, usando o procedimento de ajuste de curva de dose - resposta de 4 parâmetros. Os valores IC₅₀ são definidos como a concentração onde o crescimento é reduzido 50 % se comparado com culturas de controlo não tratadas. Cada concentração foi testada quatro vezes.

Exemplo 26 - Purificação de Trastuzumab

Um balão contendo 440 mg de anticorpo HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Patente US N° 5821337) foi dissolvido em 50 ml de tampão MES (25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 5,6) e carregados numa coluna de troca catiónica (Sepharose S, 15 cm x 1,7 cm) que havia sido equilibrada no mesmo tampão. A coluna foi, então, lavada com o mesmo tampão (5 volumes de coluna). Trastuzumab foi eluído por elevação da concentração de NaCl do tampão para 200 mM. Frações contendo o anticorpo foram agrupadas, diluídas a 10 mg/ml, e dialisadas num tampão contendo 50 mM de fosfato de

potássio, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6,5.

Exemplo 27 - Preparação de Trastuzumab-MC-MMAE por Conjugação de Trastuzumab e MC-MMAE

Trastuzumab dissolvido em borato de sódio 500 mM e cloreto de sódio 500 mM a um pH de 8,0 é tratado com um excesso de ditiotreitol (DTT) 100 mM. Após incubação a 37 °C durante cerca de 30 minutos, o tampão é trocado por eluição com resina Sephadex G25 e eluído com PBS com DTPA 1 mM. O valor tiol/Ab é verificado por determinação da concentração de anticorpo reduzido a partir da absorvância a 280 nm da solução e a concentração de tiol pela reação com DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) e a determinação da absorvância a 412 nm. O anticorpo reduzido dissolvido em PBS é arrefecido em gelo.

O reagente de ligante de fármaco, maleimidocaproílmonometil auristatina E (MMAE), isto é MC-MMAE, dissolvido em DMSO, é diluído em acetonitrilo e água em concentração conhecida, e adicionado ao anticorpo trastuzumab reduzido arrefecido em PBS. Após cerca de 1 hora, um excesso de maleimida é adicionado para resfriar rapidamente a reação e capear quaisquer grupos tióis de anticorpo não reagidos. A mistura de reação é concentrada por ultrafiltração centrífuga e trastuzumab-MC-MMAE é purificado e dessalinizado por eluição através de resina G25 em PBS, filtrado através de filtros de 0,2 µm sob condições estéreis, e congelado para armazenagem.

Exemplo 28 - Preparação de Trastuzumab-MC-MMAF por Conjugação de Trastuzumab e MC-MMAF

Trastuzumab-MC-MMAF foi preparado pela conjugação de trastuzumab e MC-MMAF seguindo o procedimento do Exemplo 27.

Exemplo 29 - Preparação de Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE por Conjugação de Trastuzumab e MC-val-cit-PAB-MMAE

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE foi preparado pela conjugação de trastuzumab e MC-val-cit-PAB-MMAE seguindo o

procedimento do Exemplo 27.

Exemplo 30 - Preparação de Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF por Conjugação de trastuzumab e MC-val-cit-PAB-MMAF 9

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF foi preparado pela conjugação de trastuzumab e MC-val-cit-PAB-MMAF 9 seguindo o procedimento do Exemplo 27.

Exemplo 31 - Toxicidade em Rato

O perfil de toxicidade aguda de fármacos e ADC livres foi avaliado em ratos Sprague-Dawley adolescentes (75-125 g cada, Charles River Laboratories (Hollister, CA)) Os animais foram injetados no dia 1, perfis completos da química e hematologia foram obtidos na linha basal, dia 3 e dia 5 e uma necropsia completa foi executada no dia 5. Medições de enzima hepática foram efetuadas em todos os animais e histologia de rotina foi executada em três animais de forma aleatória para cada grupo para os tecidos a seguir: esterno, fígado, rins, timo, baço, intestino grosso e delgado. Os grupos experimentais foram como se segue:

Grupo	Administrado	mg/kg	$\mu\text{g MMAF}/\text{m}^2$	MMAF/MAB	N/sexo
1	Veículo	0	0	0	2/F
2	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	9,94	840	4,2	6/F
3	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	24,90	2105	4,2	6/F
4	trastuzumab-MC (Me) -val-cit-PAB-MMAF	10,69	840	3,9	6/F
5	trastuzumab-MC (Me) -val-cit-PAB-MMAF	26,78	2105	3,9	6/F
6	trastuzumab-MC-MMAF	10,17	840	4,1	6/F
7	trastuzumab-MC-MMAF	25,50	2105	4,1	6/F
8	trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF	21,85	2105	4,8	6/F

Para trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC (Me) -val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF e trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, o $\mu\text{g MMAF}/\text{m}^2$ foi calculado usando 731,5

como o Peso Molecular (PM) de MMAF e 145167 como o PM de Herceptin.

A área superficial corporal foi calculada como se segue: $[(\text{peso corporal em gramas a } 0,667 \text{ de força}) \times 11,8\text{J}/10000]$. (Guidance for Industry and Reviewers, 2002).

As soluções de dose foram administradas por uma injeção única intravenosa em bolo na veia da cauda no Dia 1 do Estudo num volume de dose de 10 ml/kg. Os pesos corporais dos animais foram medidos antes da dose no Dia 1 do Estudo e diariamente no período restante. Sangue total foi colhido em tubos contendo EDTA para análise hematológica. Sangue total foi colhido em tubos com separador de soro para análise de química clínica. Amostras de sangue foram colhidas antes da dose no Dia 4 do Estudo, Dia 3 do Estudo e Dia 5 do Estudo. Sangue total foi também colhido em tubos contendo heparina de sódio na necropsia e o plasma foi congelado a -70°C para possível análise posterior. Os tecidos a seguir foram colhidos e colocados em formalina tamponada neutra na necropsia: fígado, rins, coração, timo, baço, cérebro, esterno e seções do trato GI, incluindo estômago, intestino grosso e delgado. O esterno, intestino delgado, intestino grosso, fígado, timo, baço e rins foram examinados.

Os níveis de enzima sérico associados a o fígado em cada ponto no tempo foram comparados a um intervalo (de 5 a 95 por cento) de ratos Sprague-Dawley fêmeas normais. Contagens de leucócitos e plaquetas em cada ponto no tempo foram comparadas com um intervalo (5 a 95 por cento) de ratos Sprague-Dawley fêmeas normais.

Estudo de alta dose em ratos Sprague-Dawley fêmeas normais:

Grupo 1:	Veículo
Grupo 2:	trastuzumab-MC-MMAF, 52,24 mg/kg, 4210 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
Grupo 3:	trastuzumab-MC-MMAF, 68,25 mg/kg, 5500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
Grupo 4:	trastuzumab-MC-MMAF, 86,00 mg/kg, 6930 $\mu\text{g}/\text{m}^2$

Tecidos de 11 animais foram submetidos a histologia de rotina. Estes animais haviam participado de um estudo de toxicidade aguda de intervalo de dosagem usando um imunoconjugado trastuzumab-MC-MMAF. Os animais foram acompanhados durante 12 dias após a dosagem.

Exemplo 32 - Toxicidade/Segurança em Macaco Cynomolgus

Três grupos de quatro (2 machos, 2 fêmeas) *Macaca fascicularis* naive (macaco cynomolgus) foram estudados em relação a tratamento com trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE e trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF. A administração intravenosa foi conduzida nos dias 1 e 22 dos estudos.

Amostra	Grupo	Dose
Veículo	1	Dia 1
	1M/1F	Dia 22
H-MC-vc-PAB-MMAE	2	180 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (0,5 mg/kg/) no dia 1
	2M/2F	1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (3,0 mg/kg) no dia 22
H-MC-vc-PAB-MMAE	3	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg/) no dia 8
	2M/2F	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) no dia 29
H-MC-vc-PAB-MMAE	4	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg/) no dia 15
	2M/2F	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) no dia 36
H-MC-vc-PAB-MMAF	2	180 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (0,5 mg/kg/) no dia 1
	2M/2F	1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (3,0 mg/kg) no dia 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	3	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg/) no dia 1
	2M/2F	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) no dia 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	4	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg/) no dia 1
	2M/2F	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) no dia 22
H = trastuzumab		

A dosagem é expressa na área superficial de um animal de modo a ser relevante a outras espécies, isto é, dosagem em $\mu\text{g}/\text{m}^2$ é dependente da espécie e, dessa maneira, comparável entre espécies. As formulações de ADC continham PBS, fosfato de sódio a 5,4 mM, fosfato de potássio a 4,2

mM, cloreto de sódio a 140 mM, pH 6,5.

O sangue foi colhido para análise hematológica antes da dose, e 5 minutos, 6 horas, 10 horas, e 1, 3, 5, 7, 14, 21 dias após cada dose. Contagens de eritrócito (RBC) e plaqueta (PLT) foram efetuadas pelo método de difusão de luz. A contagem de leucócitos (WBC) foi efetuada pelo método de peroxidase/basófilo. A contagem de reticulócito foi efetuada pelo método de difusão de luz com corante catiónico. Contagens de célula foram efetuadas num aparelho Advia 120. ALT (aminotransferase alanina) e AST (aminotransferase aspartato) foram medidos em U/L por UV/NADH; metodologia IFCC num equipamento Olympus AU400, e usando os testes Ab ELISA Total - ECD/GxhuFc-HRP. Conj. Ab ELISA - MMAE/MMAF//ECD- Bio/SA-HRP.

Exemplo 33 - Produção, Caracterização e Humanização de Anticorpo Monoclonal Anti-ErbB2 4D5

O anticorpo monoclonal de murino 4D5 que se liga especificamente ao domínio extracelular de ErbB2 foi produzido conforme descrito em Fendly *et al.* (1990) Cancer Research 50:1550-1558. Em resumo, células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ (que expressam cerca de 1×10^5 moléculas ErbB2/célula) produzidas conforme descrito em Hudziak *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7158-7163 (1987) foram colhidas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo EDTA a 25 mM e usadas para imunizar ratinhos BALB/c. Os ratinhos receberam injeções i.p. de 10^7 células em 0,5 ml de PBS nas semanas 0, 2, 5 e 7. Os ratinhos com antissoro que precipitou imunologicamente ³²P-ErbB2 marcado receberam injeções i.p. de um extrato de membrana de ErbB2 purificado de aglutinina/Sepharose de germe de trigo (WGA) nas semanas 9 e 13. Isto foi seguido por uma injeção i.v. de 0,1 ml da preparação de ErbB2 e os esplenócitos foram fundidos com a linha de mieloma de ratinho X63-Ag8.653. Flutuantes de hibridoma foram explorados quanto à ligação a ErbB2 por ELISA e radioimunoprecipitação.

Mapeamento e Caracterização de Epítopo

O epítopo de ErbB2 ligado por anticorpo monoclonal 4D5 foi determinado por análise de ligação competitiva (Fendly *et al.* Cancer Research 50:1550-1558 (1990). Estudos de bloqueio cruzado foram efetuados por fluorescência direta em células intactas usando a "PANDEX™ Screen Machine" para quantificar a fluorescência. O anticorpo monoclonal foi conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimentos estabelecidos (Wofsy *et al.* Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel e Schiigi (eds.) São Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Monocamadas confluentes de células de NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ foram tripsinizadas, lavadas uma vez, e suspensas novamente a $1,75 \times 10^6$ células/ml em PBS frio contendo 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA) e 0,1 % de NaN₃. Uma concentração final de 1 % de partículas de látex (IDC, Portland, OR) foi adicionado para reduzir a coagulação das membranas da lâmina PANDEX™. Células em suspensão, 20 e 20 µl de anticorpos monoclonais purificados (100 µg/ml a 0,1 µg/ml) foram adicionadas aos poços da lâmina PANDEX™ e incubados em gelo durante 30 minutos. Uma diluição predeterminada para o anticorpo monoclonal marcado com FITC em 20 µl foi adicionada em cada poço, incubada durante 30 minutos, lavada, e a fluorescência foi quantificada pelo PANDEX™. Anticorpos monoclonais partilham um epítopo se cada ligação bloqueada do outro em 50 % ou mais, em comparação com um controlo de anticorpo monoclonal irrelevante. Neste experiência, o anticorpo monoclonal 4D5 foi designado epítopo I (resíduos de aminoácidos de cerca de 529 a cerca de 625, inclusive dentro do domínio extracelular de ErbB2).

As características inibidoras de crescimento de anticorpo monoclonal 4D5 foram avaliadas usando a linha celular tumoral, SK-BR-3 (veja-se Hudziak *et al.* (1989) Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172). Em resumo, células SK-

BR-3 foram separadas usando 0,25 % (vol/vol) de tripsina e suspensas em meio completo a uma densidade de 4×10^5 células por ml. Alíquotas de 100 μ l (4×10^4 células) foram colocadas na lâmina em lâminas de microdiluição de 96 poços, as células foram deixadas aderir, e 100 μ l de meio sozinho ou meio contendo anticorpo monoclonal (concentração final 5 μ g/ml) foram adicionados. Após 72 horas, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,5), coradas com violeta cristal (0,5 % em metanol), e analisadas quando a proliferação relativa de célula conforme descrito por Sugarman et al. (1985) Science 230:943-945. Anticorpo monoclonal 4D5 inibiu a proliferação relativa de célula SK-BR-3 em cerca de 56 %.

O anticorpo monoclonal 4D5 foi também avaliado quanto à sua capacidade para inibir fosforilação de tirosina estimulada por HRG das proteínas nos intervalos de M_r 180.000 de lisados de célula total de células MCF7 (Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465). É relatado que células MCF7 expressam todos os recetores ErbB conhecidos, mas em níveis relativamente baixos. Visto que ErbB2, ErbB3, 3 ErbB4 têm tamanhos moleculares quase idênticos, não é possível discernir qual proteína está se tornando fosforilada por tirosina quando lisados de célula total são avaliados por análise de Western blot. Entretanto, estas células são ideais para análises de fosforilação de tirosina HRG porque, sob as condições de análise usadas, na ausência de HRG adicionado de forma exógena, elas exibem níveis de baixos a indetetáveis de proteínas de fosforilação de tirosina no intervalo de M_r 180.000.

As células MCF7 foram cultivadas em placas de 24 poços e anticorpos monoclonais para ErbB2 foram adicionados a cada poço e incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente, então, rHRG β ₁₇₇₋₂₄₄ foi adicionado a cada poço a uma concentração final de 0,2 nM, e a incubação foi continuada durante 8 minutos. O meio foi cuidadosamente

aspirado de cada poço, e as reações foram cessadas pela adição de 100 µl de tampão de amostra SDS (5 % de SDS, 25 mM de DTT, e 25 mM de Tris-HCl, pH 6,8). Cada amostra (25 µl) passou por eletroforese num gel de gradiente de 4-12 % (Novex) e então foi transferida eletroforeticamente para membrana de difluoreto de polivinilideno. Immunoblots de antifosfotirosina (4G10, da UBI, usada a 1 µg/ml) foram desenvolvidas, e a intensidade do intervalo reativa predominante a M_r 180.000 foi quantificada por densitometria de refletância, conforme descrito previamente (Holmes *et al.* (1992) *Science* 256:1205-1210; Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994)).

Anticorpo monoclonal 4D5 inibiu significativamente a geração de sinal de fosforilação de tirosina induzida por HRG a M_r 180.000. Na ausência de HRG, mas foi incapaz de estimular fosforilação de tirosina de proteínas no intervalo de M_r 180.000 (SIC). Também, este anticorpo não tem reação cruzada com EGFR (Fendly *et al.* *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)), ErbB3, ou ErbB4. O anticorpo monoclonal 4D5 foi capaz de bloquear a estimulação de HRG de fosforilação de tirosina em 50 %.

O efeito inibidor de crescimento de anticorpo monoclonal 4D5 em células MDA-MB-175 e SK-BR-3 na presença ou ausência de rHRGβ1 exógeno foi avaliado (Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). Os níveis de ErbB2 em células MDA-MB-175 são 4-6 vezes mais elevados do que o nível encontrado em células epiteliais de mama normais e o recetor ErbB2-ErbB4 é constitutivamente fosforilado por tirosina em células MDA-MB-175. O anticorpo monoclonal 4D5 foi capaz de inibir a proliferação celular de células MDA-MB-175 tanto na presença quanto na ausência de HRG exógeno. A inibição de proliferação celular pelo 4D5 é dependente do nível de expressão de ErbB2 (Lewis *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)). Uma inibição máxima de 66 % nas células SK-BR3 poderia ser detetada. Entretanto, este

efeito seria suplantado por HRG exógeno.

O anticorpo monoclonal de murino 4D5 foi humanizado, usando uma estratégia de "mutagénese de conversão de gene", conforme descrito na Patente US N° 5821337. O anticorpo monoclonal humanizado 4D5 usado nas experiências a seguir é designado huMAb4D5-8. Este anticorpo é do isotipo IgG1.

Lista De Sequências

<110> Doronina, Svetlana O.

Toki, Brian E.

Senter, Peter D.

Ebens, Allen J.

Polakis, Paul

Sliwowski, Mark X.

Spencer, Susan D

Kline, Toni Beth

<120> COMPOSTOS DE MONOMETILVALINA CAPAZES DE CONJUGAÇÃO A LIGANDOS

<130> 018891-001020PC

<141> 05-11-2004

<150> US 60/598.899

<151> 04-08-2004

<150> US 60/557.116

<151> 26-03-2004

<150> US 60/518.534

<151> 06-11-2003

<160> 35

EP2489364B1

<210> 1

<211> 502

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly	Lys	Leu	Asn	Val	Gly	Thr	Lys	Lys
1				5					10					15
Glu	Asp	Gly	Glu	Ser	Thr	Ala	Pro	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Val	Leu
				20					25					30
Arg	Cys	Lys	Cys	His	His	His	Cys	Pro	Glu	Asp	Ser	Val	Asn	Asn
				35					40					45
Ile	Cys	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Cys	Phe	Thr	Met	Ile	Glu	Glu	Asp
				50					55					60
Asp	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Leu	Gly	Leu	Glu
				65					70					75
Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Arg	Asp	Thr	Pro	Ile	Pro	His	Gln	Arg
				80					85					90
Arg	Ser	Ile	Glu	Cys	Cys	Thr	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Asn	Lys	Asp
				95					100					105
Leu	His	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Asp
				110					115					120
Gly	Pro	Ile	His	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Cys
				125					130					135

Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Cys	Tyr	Phe	Arg	Tyr		140	145	150
Lys	Arg	Gln	Glu	Thr	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln		155	160	165
Asp	Glu	Thr	Tyr	Ile	Pro	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Ile		170	175	180
Glu	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu	Leu		185	190	195
Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Met	Val	Lys	Gln	Ile		200	205	210
Gly	Lys	Gly	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Lys	Trp	Arg	Gly		215	220	225
Glu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ser		230	235	240
Trp	Phe	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Leu	Met	Arg	His		245	250	255
Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Gly	Thr	Gly		260	265	270
Ser	Trp	Thr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	His	Glu	Asn	Gly		275	280	285
Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Ser	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser		290	295	300
Met	Leu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Leu	Cys	His	Leu		305	310	315
His	Thr	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His		320	325	330
Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Thr		335	340	345
Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Phe	Ile	Ser	Asp		350	355	360
Thr	Asn	Glu	Val	Asp	Ile	Pro	Pro	Asn	Thr	Arg	Val	Gly	Thr	Lys		365	370	375
Arg	Tyr	Met	Pro	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Glu	Ser	Leu	Asn	Arg	Asn		380	385	390
His	Phe	Gln	Ser	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Met	Tyr	Ser	Phe	Gly	Leu		395	400	405
Ile	Leu	Trp	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	Cys	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Val		410	415	420
Glu	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Pro		425	430	435
Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Ile	Lys	Lys	Leu	Arg				

EP2489364B1

				440					445					450
Pro	Ser	Phe	Pro	Asn	Arg	Trp	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Arg	Gln
				455					460					465
Met	Gly	Lys	Leu	Met	Thr	Glu	Cys	Trp	Ala	His	Asn	Pro	Ala	Ser
				470					475					480
Arg	Leu	Thr	Ala	Leu	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Ser
				485					490					495
Glu	Ser	Gln	Asp	Ile	Lys	Leu								
				500										

<210> 2

<211> 507

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Pro	Lys	Arg	Arg	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ala	1	5	10	15
Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Lys	Met	Leu	Ala	Ala	Lys	20	25	30	
Ser	Ala	Asp	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Val	Thr	35	40	45	
Leu	Gln	Arg	Asn	Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Val	Ala	Ile	Ile	Val	50	55	60	
Gly	Thr	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Val	Thr	Pro	Thr	Gly	Val	65	70	75	
Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Trp	Ala	80	85	90	
Ala	Cys	Gly	Val	Phe	Ser	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Cys	Tyr	Ala	Glu	95	100	105	
Leu	Gly	Thr	Thr	Ile	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Met	110	115	120	
Leu	Glu	Val	Tyr	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	Trp	Ile	125	130	135	
Glu	Leu	Leu	Ile	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Gln	Tyr	Ile	Val	Ala	Leu	140	145	150	
Val	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu	Phe	Pro	Thr	Cys	Pro	155	160	165	
Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Cys	Leu	Cys	Val	Leu	170	175	180	
Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Asn	Cys	Tyr	Ser	Val	Lys	Ala	Ala	Thr	Arg	185	190	195	
Val	Gln	Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	200	205	210	

Ile Ile Leu Leu Gly Phe Val Gln Ile Gly Lys Gly Val Val Ser	215	220	225
Asn Leu Asp Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Asp Val	230	235	240
Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly	245	250	255
Gly Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro	260	265	270
Tyr Arg Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val	275	280	285
Thr Leu Val Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu	290	295	300
Ser Thr Glu Gln Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe	305	310	315
Gly Asn Tyr His Leu Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe	320	325	330
Val Gly Leu Ser Cys Phe Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr	335	340	345
Ser Ser Arg Leu Phe Phe Val Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro	350	355	360
Ser Ile Leu Ser Met Ile His Pro Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro	365	370	375
Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met Thr Leu Leu Tyr Ala Phe Ser	380	385	390
Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe Phe Ser Phe Phe Asn Trp	395	400	405
Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met Ile Trp Leu Arg His	410	415	420
Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val Asn Leu Ala Leu	425	430	435
Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile Ala Val Ser	440	445	450
Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr Ile Ile	455	460	465
Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys Asn	470	475	480
Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu	485	490	495
Cys Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr	500	505	

EP2489364B1

<210> 3

<211> 339

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Glu	Ser	Arg	Lys	Asp	Ile	Thr	Asn	Gln	Glu	Glu	Leu	Trp	Lys	1	5	10	15
Met	Lys	Pro	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Leu	His	Lys	20	25	30	
Asp	Thr	Gly	Glu	Thr	Ser	Met	Leu	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Leu	His	35	40	45	
Leu	His	Gln	Thr	Ala	His	Ala	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Pro	Ser	Glu	50	55	60	
Leu	Gln	His	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Pro	Gln	Trp	His	Leu	Pro	Ile	65	70	75	
Lys	Ile	Ala	Ala	Ile	Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Leu	80	85	90	
Leu	Arg	Glu	Val	Ile	His	Pro	Leu	Ala	Thr	Ser	His	Gln	Gln	Tyr	95	100	105	
Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Val	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Pro	Met	110	115	120	
Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Val	Ile	125	130	135	
Ala	Ala	Ile	Val	Gln	Leu	His	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Lys	Lys	Phe	140	145	150	
Pro	His	Trp	Leu	Asp	Lys	Trp	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Gln	Phe	Gly	155	160	165	
Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Val	Leu	His	Ala	Ile	Tyr	Ser	Leu	170	175	180	
Ser	Tyr	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Trp	185	190	195	
Ala	Tyr	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Trp	Ile	Glu	200	205	210	
His	Asp	Val	Trp	Arg	Met	Glu	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	215	220	225	
Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser	230	235	240	
Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Trp	Arg	Glu	Phe	His	Tyr	Ile	Gln	Ser	245	250	255	
Lys	Leu	Gly	Ile	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ile	His	Ala	Leu	260	265	270	
Ile	Phe	Ala	Trp	Asn	Lys	Trp	Ile	Asp	Ile	Lys	Gln	Phe	Val	Trp				

EP2489364B1

	275		280		285
Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val					
	290		295		300
Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys					
	305		310		315
Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile					
	320		325		330
Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu					
	335				

<210> 4

<211> 6995

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Pro	Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Thr	Asp	1	5	10	15
Arg	Met	Gly	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	20	25	30	
Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	His	Glu	Arg	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	35	40	45	
Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Met	Gln	Pro	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Val	Thr	50	55	60	
Asn	Val	Arg	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	His	Glu	Ser	Gln	Ser	Ser	Val	65	70	75	
Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Lys	Ala	Thr	Ser	Pro	Met	Gly	Thr	80	85	90	
Thr	Tyr	Thr	Met	Gly	Glu	Thr	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Ser	Asp	95	100	105	
Phe	Phe	Glu	Thr	Ser	Arg	Ile	Gln	Ile	Glu	Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	110	115	120	
Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Glu	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Ser	Ser	125	130	135	
Ala	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	140	145	150	
Thr	Thr	Glu	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Thr	155	160	165	
Ser	Met	Ser	Gly	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Ile	Ser	170	175	180	
Thr	Glu	Ala	Ile	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Met	Thr	Glu	185	190	195	
Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Ile	Glu	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	200	205	210	

Thr	Ser	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	215	220	225
Trp	Ser	Gly	Thr	His	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Phe	Ser	His	Ser	230	235	240
Glu	Met	Thr	Thr	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Asp	Val	Pro	Trp	245	250	255
Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	260	265	270
Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Met	Thr	Ser	Thr	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Leu	275	280	285
Pro	Glu	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	290	295	300
Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Lys	Thr	Thr	Asp	Met	Leu	Arg	Thr	Ser	Ser	305	310	315
Glu	Pro	Glu	Thr	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	320	325	330
Glu	Ile	Leu	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Arg	Glu	Lys	Ile	335	340	345
His	Pro	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Val	Gly	Thr	Val	Ile	350	355	360
Tyr	Lys	His	Leu	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Thr	365	370	375
Thr	Lys	Pro	Thr	Ser	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gly	Asn	380	385	390
Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Pro	Glu	Thr	Met	Met	395	400	405
Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Glu	Ile	Ser	410	415	420
Thr	Ser	Gln	Glu	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	425	430	435
Ser	Gly	Met	Pro	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Lys	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	440	445	450
Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Arg	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Gln	Ser	455	460	465
Thr	Ile	Ser	Pro	Glu	Ile	Ser	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Arg	Ile	Ser	470	475	480
Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Ser	Ala	Glu	Met	Thr	Ile	Thr	Pro	485	490	495
Lys	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Leu	500	505	510

Asp Thr Ser Ser Arg Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Ala
 515 520 525
 Thr His Arg Ser Pro His Ser Gly Met Thr Thr Pro Met Ser Arg
 530 535 540
 Gly Pro Glu Asp Val Ser Trp Pro Ser Arg Pro Ser Val Glu Lys
 545 550 555
 Thr Ser Pro Pro Ser Ser Leu Val Ser Leu Ser Ala Val Thr Ser
 560 565 570
 Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Thr Pro Ser Glu Ser Ser His Ser Ser
 575 580 585
 Pro Leu Arg Val Thr Ser Leu Phe Thr Pro Val Met Met Lys Thr
 590 595 600
 Thr Asp Met Leu Asp Thr Ser Leu Glu Pro Val Thr Thr Ser Pro
 605 610 615
 Pro Ser Met Asn Ile Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Thr Ser Lys
 620 625 630
 Ala Thr Met Glu Thr Glu Ala Ile Gln Leu Ser Glu Asn Thr Ala
 635 640 645
 Val Thr Gln Met Gly Thr Ile Ser Ala Arg Gln Glu Phe Tyr Ser
 650 655 660
 Ser Tyr Pro Gly Leu Pro Glu Pro Ser Lys Val Thr Ser Pro Val
 665 670 675
 Val Thr Ser Ser Thr Ile Lys Asp Ile Val Ser Thr Thr Ile Pro
 680 685 690
 Ala Ser Ser Glu Ile Thr Arg Ile Glu Met Glu Ser Thr Ser Thr
 695 700 705
 Leu Thr Pro Thr Pro Arg Glu Thr Ser Thr Ser Gln Glu Ile His
 710 715 720
 Ser Ala Thr Lys Pro Ser Thr Val Pro Tyr Lys Ala Leu Thr Ser
 725 730 735
 Ala Thr Ile Glu Asp Ser Met Thr Gln Val Met Ser Ser Ser Arg
 740 745 750
 Gly Pro Ser Pro Asp Gln Ser Thr Met Ser Gln Asp Ile Ser Thr
 755 760 765
 Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Lys Thr Glu Ser
 770 775 780
 Thr Glu Met Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Ser Pro Gly Ala Thr
 785 790 795
 Ser Arg Gly Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Thr Thr Phe Met Ser
 800 805 810
 Gly Thr His Ser Thr Ala Ser Gln Gly Phe Ser His Ser Gln Met

815					820					825				
Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Glu	Val	Pro	Trp	Leu	Ser
				830					835					840
His	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser
				845					850					855
Ser	Pro	Val	Met	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro
				860					865					870
Asp	Ser	Ile	His	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr
				875					880					885
Ser	Gly	Leu	Val	Lys	Thr	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ser	Ser	Glu
				890					895					900
Pro	Glu	Thr	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	Glu
				905					910					915
Ile	Leu	Ala	Thr	Thr	Glu	Val	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Lys	Leu	Glu
				920					925					930
Met	Thr	Asn	Val	Val	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	His	Glu	Ser	Pro	Ser
				935					940					945
Ser	Val	Leu	Ala	Asp	Ser	Val	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Ser	Ser	Met
				950					955					960
Gly	Ile	Thr	Tyr	Pro	Thr	Gly	Asp	Thr	Asn	Val	Leu	Thr	Ser	Thr
				965					970					975
Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Thr	Ser	Arg	Ile	Gln	Thr	Lys	Ser	Lys	Leu
				980					985					990
Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Leu	Met	Glu	Thr	Ser	Ile	Ser	Glu	Glu	Thr
				995					1000					1005
Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Lys	Ser	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Thr
				1010					1015					1020
Gly	Ala	Thr	Thr	Glu	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	Ile	Ser	Ser	Ser
				1025					1030					1035
Arg	Thr	Ser	Ile	Pro	Gly	Pro	Ala	Gln	Ser	Thr	Met	Ser	Ser	Asp
				1040					1045					1050
Thr	Ser	Met	Glu	Thr	Ile	Thr	Arg	Ile	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Arg
				1055					1060					1065
Lys	Glu	Ser	Thr	Asp	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Lys	Thr	Gly	Pro	Ser
				1070					1075					1080
Gly	Ala	Thr	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr
				1085					1090					1095
Ala	Ser	Trp	Pro	Gly	Thr	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Gln	Arg	Phe	Pro
				1100					1105					1110
Arg	Ser	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Met	Ser	Arg	Gly	Pro	Glu	Asp	Val
				1115					1120					1125

Ser Trp Pro Ser Pro Leu Ser Val Glu Lys Asn Ser Pro Pro Ser	1130	1135	1140
Ser Leu Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Ser Pro Ser Pro Leu Tyr	1145	1150	1155
Ser Thr Pro Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Pro Val Pro Val Thr	1160	1165	1170
Ser Leu Phe Thr Ser Ile Met Met Lys Ala Thr Asp Met Leu Asp	1175	1180	1185
Ala Ser Leu Glu Pro Glu Thr Thr Ser Ala Pro Asn Met Asn Ile	1190	1195	1200
Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Ala Ser Lys Ala Thr Thr Glu Thr	1205	1210	1215
Glu Ala Ile His Val Phe Glu Asn Thr Ala Ala Ser His Val Glu	1220	1225	1230
Thr Thr Ser Ala Thr Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Phe	1235	1240	1245
Ser Glu Pro Thr Lys Val Ile Ser Pro Val Val Thr Ser Ser Ser	1250	1255	1260
Ile Arg Asp Asn Met Val Ser Thr Thr Met Pro Gly Ser Ser Gly	1265	1270	1275
Ile Thr Arg Ile Glu Ile Glu Ser Met Ser Ser Leu Thr Pro Gly	1280	1285	1290
Leu Arg Glu Thr Arg Thr Ser Gln Asp Ile Thr Ser Ser Thr Glu	1295	1300	1305
Thr Ser Thr Val Leu Tyr Lys Met Pro Ser Gly Ala Thr Pro Glu	1310	1315	1320
Val Ser Arg Thr Glu Val Met Pro Ser Ser Arg Thr Ser Ile Pro	1325	1330	1335
Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Leu Asp Ile Ser Asp Glu Val	1340	1345	1350
Val Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu Ser Ala Glu	1355	1360	1365
Ile Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Gln	1370	1375	1380
Val Thr Leu Pro Leu Gly Thr Ser Met Thr Phe Leu Ser Gly Thr	1385	1390	1395
His Ser Thr Met Ser Gln Gly Leu Ser His Ser Glu Met Thr Asn	1400	1405	1410
Leu Met Ser Arg Gly Pro Glu Ser Leu Ser Trp Thr Ser Pro Arg	1415	1420	1425

Phe Val Glu Thr Thr Arg Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro
 1430 1435 1440
 Leu Thr Thr Ser Leu Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Leu Asp Ser
 1445 1450 1455
 Ser Pro Ser Ser Pro Leu Pro Val Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly
 1460 1465 1470
 Leu Val Lys Thr Thr Glu Val Leu Asp Thr Ser Ser Glu Pro Lys
 1475 1480 1485
 Thr Ser Ser Ser Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Val Glu Ile Pro
 1490 1495 1500
 Ala Thr Ser Glu Ile Met Thr Asp Thr Glu Lys Ile His Pro Ser
 1505 1510 1515
 Ser Asn Thr Ala Val Ala Lys Val Arg Thr Ser Ser Ser Val His
 1520 1525 1530
 Glu Ser His Ser Ser Val Leu Ala Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr
 1535 1540 1545
 Ile Pro Ser Met Gly Ile Thr Ser Ala Val Glu Asp Thr Thr Val
 1550 1555 1560
 Phe Thr Ser Asn Pro Ala Phe Ser Glu Thr Arg Arg Ile Pro Thr
 1565 1570 1575
 Glu Pro Thr Phe Ser Leu Thr Pro Gly Phe Arg Glu Thr Ser Thr
 1580 1585 1590
 Ser Glu Glu Thr Thr Ser Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Phe
 1595 1600 1605
 Gly Val Pro Thr Ser Ala Thr Thr Glu Val Ser Met Thr Glu Ile
 1610 1615 1620
 Met Ser Ser Asn Arg Thr His Ile Pro Asp Ser Asp Gln Ser Thr
 1625 1630 1635
 Met Ser Pro Asp Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Ser
 1640 1645 1650
 Ser Ser Met Met Ser Glu Ser Thr Gln Met Thr Ile Thr Thr Gln
 1655 1660 1665
 Lys Ser Ser Pro Gly Ala Thr Ala Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ala
 1670 1675 1680
 Thr Thr Thr Ala Pro Leu Ala Arg Thr His Ser Thr Val Pro Pro
 1685 1690 1695
 Arg Phe Leu His Ser Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Ser Pro
 1700 1705 1710
 Glu Asn Pro Ser Trp Lys Ser Ser Pro Phe Val Glu Lys Thr Ser
 1715 1720 1725
 Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser

1730	1735	1740
Val Ser Ser Thr Leu Pro Gln Ser Ile Pro Ser Ser Ser Phe Ser 1745 1750 1755		
Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Met Val Lys Thr Thr Asp Thr 1760 1765 1770		
Ser Thr Glu Pro Gly Thr Ser Leu Ser Pro Asn Leu Ser Gly Thr 1775 1780 1785		
Ser Val Glu Ile Leu Ala Ala Ser Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu 1790 1795 1800		
Lys Ile His Pro Ser Ser Ser Met Ala Val Thr Asn Val Gly Thr 1805 1810 1815		
Thr Ser Ser Gly His Glu Leu Tyr Ser Ser Val Ser Ile His Ser 1820 1825 1830		
Glu Pro Ser Lys Ala Thr Tyr Pro Val Gly Thr Pro Ser Ser Met 1835 1840 1845		
Ala Glu Thr Ser Ile Ser Thr Ser Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr 1850 1855 1860		
Thr Gly Phe Glu Ala Glu Pro Phe Ser His Leu Thr Ser Gly Leu 1865 1870 1875		
Arg Lys Thr Asn Met Ser Leu Asp Thr Ser Ser Val Thr Pro Thr 1880 1885 1890		
Asn Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ser Thr His Leu Leu Gln Ser Ser 1895 1900 1905		
Lys Thr Asp Phe Thr Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Pro Asp Trp 1910 1915 1920		
Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Thr Glu Ile Pro Val Asp Ile Ile Thr 1925 1930 1935		
Pro Phe Asn Ala Ser Pro Ser Ile Thr Glu Ser Thr Gly Ile Thr 1940 1945 1950		
Ser Phe Pro Glu Ser Arg Phe Thr Met Ser Val Thr Glu Ser Thr 1955 1960 1965		
His His Leu Ser Thr Asp Leu Leu Pro Ser Ala Glu Thr Ile Ser 1970 1975 1980		
Thr Gly Thr Val Met Pro Ser Leu Ser Glu Ala Met Thr Ser Phe 1985 1990 1995		
Ala Thr Thr Gly Val Pro Arg Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Pro 2000 2005 2010		
Phe Ser Arg Thr Glu Ser Gly Pro Gly Asp Ala Thr Leu Ser Thr 2015 2020 2025		
Ile Ala Glu Ser Leu Pro Ser Ser Thr Pro Val Pro Phe Ser Ser 2030 2035 2040		

Ser Thr Phe Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Ile Pro Ala Leu His		
2045	2050	2055
Glu Ile Thr Ser Ser Ser Ala Thr Pro Tyr Arg Val Asp Thr Ser		
2060	2065	2070
Leu Gly Thr Glu Ser Ser Thr Thr Glu Gly Arg Leu Val Met Val		
2075	2080	2085
Ser Thr Leu Asp Thr Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Ser Ser Ser		
2090	2095	2100
Pro Ile Leu Asp Thr Arg Met Thr Glu Ser Val Glu Leu Gly Thr		
2105	2110	2115
Val Thr Ser Ala Tyr Gln Val Pro Ser Leu Ser Thr Arg Leu Thr		
2120	2125	2130
Arg Thr Asp Gly Ile Met Glu His Ile Thr Lys Ile Pro Asn Glu		
2135	2140	2145
Ala Ala His Arg Gly Thr Ile Arg Pro Val Lys Gly Pro Gln Thr		
2150	2155	2160
Ser Thr Ser Pro Ala Ser Pro Lys Gly Leu His Thr Gly Gly Thr		
2165	2170	2175
Lys Arg Met Glu Thr Thr Thr Thr Ala Leu Lys Thr Thr Thr Thr		
2180	2185	2190
Ala Leu Lys Thr Thr Ser Arg Ala Thr Leu Thr Thr Ser Val Tyr		
2195	2200	2205
Thr Pro Thr Leu Gly Thr Leu Thr Pro Leu Asn Ala Ser Met Gln		
2210	2215	2220
Met Ala Ser Thr Ile Pro Thr Glu Met Met Ile Thr Thr Pro Tyr		
2225	2230	2235
Val Phe Pro Asp Val Pro Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ala Thr Ser		
2240	2245	2250
Leu Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Arg Thr Thr Pro Ser		
2255	2260	2265
Val Phe Asn Arg Glu Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Val Ser Arg		
2270	2275	2280
Ser Gly Ala Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu Asp Val Ser		
2285	2290	2295
Ser Ser Glu Pro Asp Thr Thr Ala Ser Trp Val Ile His Pro Ala		
2300	2305	2310
Glu Thr Ile Pro Thr Val Ser Lys Thr Thr Pro Asn Phe Phe His		
2315	2320	2325
Ser Glu Leu Asp Thr Val Ser Ser Thr Ala Thr Ser His Gly Ala		
2330	2335	2340

Asp Val Ser Ser Ala Ile Pro Thr Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu
 2345 2350 2355
 Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile Ser Gly Thr Asp Thr Ser
 2360 2365 2370
 Thr Thr Phe Pro Thr Leu Thr Lys Ser Pro His Glu Thr Glu Thr
 2375 2380 2385
 Arg Thr Thr Trp Leu Thr His Pro Ala Glu Thr Ser Ser Thr Ile
 2390 2395 2400
 Pro Arg Thr Ile Pro Asn Phe Ser His His Glu Ser Asp Ala Thr
 2405 2410 2415
 Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ile
 2420 2425 2430
 Pro Ile Met Thr Val Ser Pro Gly Ala Glu Asp Leu Val Thr Ser
 2435 2440 2445
 Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp Arg Asn Met Thr Ile Pro Thr
 2450 2455 2460
 Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Thr Ile Ala Ser Leu Val
 2465 2470 2475
 Thr His Pro Glu Ala Gln Thr Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ser Thr
 2480 2485 2490
 Ile Ser Pro Ala Val Ser Arg Leu Val Thr Ser Met Val Thr Ser
 2495 2500 2505
 Leu Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Asn Arg Ala Leu Thr Asn Ser
 2510 2515 2520
 Pro Gly Glu Pro Ala Thr Thr Val Ser Leu Val Thr His Ser Ala
 2525 2530 2535
 Gln Thr Ser Pro Thr Val Pro Trp Thr Thr Ser Ile Phe Phe His
 2540 2545 2550
 Ser Lys Ser Asp Thr Thr Pro Ser Met Thr Thr Ser His Gly Ala
 2555 2560 2565
 Glu Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Thr Glu Val
 2570 2575 2580
 Pro Gly Val Val Thr Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Ile
 2585 2590 2595
 Ser Thr Thr Ile Pro Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Glu
 2600 2605 2610
 Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Glu Glu Ala Ser Ser
 2615 2620 2625
 Ala Ile Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Pro Gly Val Val
 2630 2635 2640
 Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile

2645	2650	2655
Pro Ile Leu Thr Phe Ser Leu Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser		
2660	2665	2670
Met Ala Thr Ser His Gly Thr Glu Ala Gly Ser Ala Val Pro Thr		
2675	2680	2685
Val Leu Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Ser Leu Val Ala Ser		
2690	2695	2700
Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Leu Pro Thr Leu Thr Leu Ser		
2705	2710	2715
Pro Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly		
2720	2725	2730
Ala Glu Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Val Ser Pro Glu Val Pro		
2735	2740	2745
Gly Val Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Ser Gly Val Asn Ser		
2750	2755	2760
Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ile Leu Ser Pro Gly Glu Leu Glu Thr		
2765	2770	2775
Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ala		
2780	2785	2790
Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Ser Gly Val Val Thr		
2795	2800	2805
Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro		
2810	2815	2820
Ile Leu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met		
2825	2830	2835
Ala Thr Ser His Gly Val Glu Ala Ser Ser Ala Val Leu Thr Val		
2840	2845	2850
Ser Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Phe Leu Val Thr Ser Ser		
2855	2860	2865
Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
2870	2875	2880
Asp Glu Pro Glu Thr Thr Thr Ser Leu Val Thr His Ser Glu Ala		
2885	2890	2895
Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu Gly Val Ser Pro Thr Val		
2900	2905	2910
Gln Gly Leu Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Thr		
2915	2920	2925
Ser Ala Phe Ser Asn Leu Thr Val Ala Ser Ser Gln Pro Glu Thr		
2930	2935	2940
Ile Asp Ser Trp Val Ala His Pro Gly Thr Glu Ala Ser Ser Val		
2945	2950	2955

Val Pro Thr Leu Thr	Val Ser Thr Gly Glu	Pro Phe Thr Asn Ile
2960	2965	2970
Ser Leu Val Thr His	Pro Ala Glu Ser Ser	Ser Thr Leu Pro Arg
2975	2980	2985
Thr Thr Ser Arg Phe	Ser His Ser Glu Leu	Asp Thr Met Pro Ser
2990	2995	3000
Thr Val Thr Ser Pro	Glu Ala Glu Ser Ser	Ser Ala Ile Ser Thr
3005	3010	3015
Thr Ile Ser Pro Gly	Ile Pro Gly Val Leu	Thr Ser Leu Val Thr
3020	3025	3030
Ser Ser Gly Arg Asp	Ile Ser Ala Thr Phe	Pro Thr Val Pro Glu
3035	3040	3045
Ser Pro His Glu Ser	Glu Ala Thr Ala Ser	Trp Val Thr His Pro
3050	3055	3060
Ala Val Thr Ser Thr	Thr Val Pro Arg Thr	Thr Pro Asn Tyr Ser
3065	3070	3075
His Ser Glu Pro Asp	Thr Thr Pro Ser Ile	Ala Thr Ser Pro Gly
3080	3085	3090
Ala Glu Ala Thr Ser	Asp Phe Pro Thr Ile	Thr Val Ser Pro Asp
3095	3100	3105
Val Pro Asp Met Val	Thr Ser Gln Val Thr	Ser Ser Gly Thr Asp
3110	3115	3120
Thr Ser Ile Thr Ile	Pro Thr Leu Thr Leu	Ser Ser Gly Glu Pro
3125	3130	3135
Glu Thr Thr Thr Ser	Phe Ile Thr Tyr Ser	Glu Thr His Thr Ser
3140	3145	3150
Ser Ala Ile Pro Thr	Leu Pro Val Ser Pro	Asp Ala Ser Lys Met
3155	3160	3165
Leu Thr Ser Leu Val	Ile Ser Ser Gly Thr	Asp Ser Thr Thr Thr
3170	3175	3180
Phe Pro Thr Leu Thr	Glu Thr Pro Tyr Glu	Pro Glu Thr Thr Ala
3185	3190	3195
Ile Gln Leu Ile His	Pro Ala Glu Thr Asn	Thr Met Val Pro Arg
3200	3205	3210
Thr Thr Pro Lys Phe	Ser His Ser Lys Ser	Asp Thr Thr Leu Pro
3215	3220	3225
Val Ala Ile Thr Ser	Pro Gly Pro Glu Ala	Ser Ser Ala Val Ser
3230	3235	3240
Thr Thr Thr Ile Ser	Pro Asp Met Ser Asp	Leu Val Thr Ser Leu
3245	3250	3255

Val Pro Ser Ser Gly Thr Asp Thr Ser Thr Thr Phe Pro Thr Leu
 3260 3265 3270
 Ser Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Trp Leu Thr
 3275 3280 3285
 His Pro Ala Glu Thr Ser Thr Thr Val Ser Gly Thr Ile Pro Asn
 3290 3295 3300
 Phe Ser His Arg Gly Ser Asp Thr Ala Pro Ser Met Val Thr Ser
 3305 3310 3315
 Pro Gly Val Asp Thr Arg Ser Gly Val Pro Thr Thr Thr Ile Pro
 3320 3325 3330
 Pro Ser Ile Pro Gly Val Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Ala
 3335 3340 3345
 Thr Asp Thr Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Thr Pro Ser Pro Gly
 3350 3355 3360
 Glu Pro Glu Thr Thr Ala Ser Ser Ala Thr His Pro Gly Thr Gln
 3365 3370 3375
 Thr Gly Phe Thr Val Pro Ile Arg Thr Val Pro Ser Ser Glu Pro
 3380 3385 3390
 Asp Thr Met Ala Ser Trp Val Thr His Pro Pro Gln Thr Ser Thr
 3395 3400 3405
 Pro Val Ser Arg Thr Thr Ser Ser Phe Ser His Ser Ser Pro Asp
 3410 3415 3420
 Ala Thr Pro Val Met Ala Thr Ser Pro Arg Thr Glu Ala Ser Ser
 3425 3430 3435
 Ala Val Leu Thr Thr Ile Ser Pro Gly Ala Pro Glu Met Val Thr
 3440 3445 3450
 Ser Gln Ile Thr Ser Ser Gly Ala Ala Thr Ser Thr Thr Val Pro
 3455 3460 3465
 Thr Leu Thr His Ser Pro Gly Met Pro Glu Thr Thr Ala Leu Leu
 3470 3475 3480
 Ser Thr His Pro Arg Thr Glu Thr Ser Lys Thr Phe Pro Ala Ser
 3485 3490 3495
 Thr Val Phe Pro Gln Val Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile
 3500 3505 3510
 Arg Pro Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Gln Thr Thr
 3515 3520 3525
 Ser Ser Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Gly Thr Ser Arg Val Asp
 3530 3535 3540
 Leu Ser Pro Thr Ala Ser Pro Gly Val Ser Ala Lys Thr Ala Pro
 3545 3550 3555
 Leu Ser Thr His Pro Gly Thr Glu Thr Ser Thr Met Ile Pro Thr

3560	3565	3570
Ser Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala		
3575	3580	3585
Thr Ser Ser Ser Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu Thr		
3590	3595	3600
Val Ser Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ser Ile Thr Thr		
3605	3610	3615
Asp Lys Pro Gln Thr Val Thr Ser Trp Asn Thr Glu Thr Ser Pro		
3620	3625	3630
Ser Val Thr Ser Val Gly Pro Pro Glu Phe Ser Arg Thr Val Thr		
3635	3640	3645
Gly Thr Thr Met Thr Leu Ile Pro Ser Glu Met Pro Thr Pro Pro		
3650	3655	3660
Lys Thr Ser His Gly Glu Gly Val Ser Pro Thr Thr Ile Leu Arg		
3665	3670	3675
Thr Thr Met Val Glu Ala Thr Asn Leu Ala Thr Thr Gly Ser Ser		
3680	3685	3690
Pro Thr Val Ala Lys Thr Thr Thr Thr Phe Asn Thr Leu Ala Gly		
3695	3700	3705
Ser Leu Phe Thr Pro Leu Thr Thr Pro Gly Met Ser Thr Leu Ala		
3710	3715	3720
Ser Glu Ser Val Thr Ser Arg Thr Ser Tyr Asn His Arg Ser Trp		
3725	3730	3735
Ile Ser Thr Thr Ser Ser Tyr Asn Arg Arg Tyr Trp Thr Pro Ala		
3740	3745	3750
Thr Ser Thr Pro Val Thr Ser Thr Phe Ser Pro Gly Ile Ser Thr		
3755	3760	3765
Ser Ser Ile Pro Ser Ser Thr Ala Ala Thr Val Pro Phe Met Val		
3770	3775	3780
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu		
3785	3790	3795
Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg		
3800	3805	3810
Glu Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Arg Asn Ser Ser Leu		
3815	3820	3825
Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Ala Ser Leu Arg Pro Glu		
3830	3835	3840
Lys Asp Ser Ser Ala Thr Ala Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg		
3845	3850	3855
Pro Asp Pro Glu Asp Leu Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp		
3860	3865	3870

Glu Leu Ser Asn Leu Thr Asn Gly Ile Gln Glu Leu Gly Pro Tyr	3875	3880	3885
Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg	3890	3895	3900
Ser Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp	3905	3910	3915
Val Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Thr Thr	3920	3925	3930
Ala Gly Pro Leu Leu Met Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr	3935	3940	3945
Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met Arg Arg Thr Gly Ser Arg Lys	3950	3955	3960
Phe Asn Thr Met Glu Ser Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu	3965	3970	3975
Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu	3980	3985	3990
Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp	3995	4000	4005
Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn	4010	4015	4020
Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Asn Asp Ile	4025	4030	4035
Glu Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val	4040	4045	4050
Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro	4055	4060	4065
Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Arg Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser	4070	4075	4080
Leu Ser Ser Pro Thr Ile Met Ala Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro	4085	4090	4095
Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp	4100	4105	4110
Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val	4115	4120	4125
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Ile Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly	4130	4135	4140
Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Lys	4145	4150	4155
Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Ile His His Leu	4160	4165	4170

Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu	4175	4180	4185
Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr	4190	4195	4200
Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Thr	4205	4210	4215
Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu	4220	4225	4230
Gly Thr Ser Gly Thr Pro Phe Ser Leu Pro Ser Pro Ala Thr Ala	4235	4240	4245
Gly Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn	4250	4255	4260
Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe	4265	4270	4275
Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Thr Leu Val Gly Pro Met Phe	4280	4285	4290
Lys Asn Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr	4295	4300	4305
Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala	4310	4315	4320
Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg	4325	4330	4335
Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys	4340	4345	4350
Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn	4355	4360	4365
Gly Phe Thr His Trp Ile Pro Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Gly	4370	4375	4380
Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro	4385	4390	4395
Ser Pro Thr Ser Ala Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr	4400	4405	4410
Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His	4415	4420	4425
Cys Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln	4430	4435	4440
Ser Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu	4445	4450	4455
Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly	4460	4465	4470
Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro			

4475	4480	4485
Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
4490	4495	4500
Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
4505	4510	4515
Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln Thr Ser Ala		
4520	4525	4530
Pro Asn Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr		
4535	4540	4545
Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gly Pro		
4550	4555	4560
Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln		
4565	4570	4575
Tyr Glu Glu Asp Met His His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr		
4580	4585	4590
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn		
4595	4600	4605
Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu		
4610	4615	4620
Arg Pro Glu Lys Asn Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Ile Cys		
4625	4630	4635
Ser His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Gln		
4640	4645	4650
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile Lys Glu Leu		
4655	4660	4665
Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe		
4670	4675	4680
Thr His Arg Ser Ser Val Ala Pro Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser		
4685	4690	4695
Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser		
4700	4705	4710
Pro Thr Thr Ala Val Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe		
4715	4720	4725
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp Met Arg His Pro Gly		
4730	4735	4740
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu		
4745	4750	4755
Gly Pro Leu Phe Lys Asn Ser Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly		
4760	4765	4770
Cys Arg Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr		
4775	4780	4785

Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Leu Asn Pro Gln Ser Pro	4790	4795	4800
Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Gln Leu Ser Gln Met Thr	4805	4810	4815
Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser	4820	4825	4830
Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Gly Leu Thr Thr	4835	4840	4845
Ser Thr Pro Trp Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr	4850	4855	4860
Pro Ser Pro Val Pro Ser Pro Thr Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val	4865	4870	4875
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu	4880	4885	4890
Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg	4895	4900	4905
Val Leu Gln Gly Leu Leu Ser Pro Ile Phe Lys Asn Ser Ser Val	4910	4915	4920
Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Pro Glu	4925	4930	4935
Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Val Cys Leu Tyr His	4940	4945	4950
Pro Asn Pro Lys Arg Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp	4955	4960	4965
Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr	4970	4975	4980
Ser Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln	4985	4990	4995
Asn Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Tyr	5000	5005	5010
Trp Ala Thr Thr Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Gly His Thr Glu	5015	5020	5025
Pro Gly Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr Phe Asn Phe Thr Ile Thr	5030	5035	5040
Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys	5045	5050	5055
Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu	5060	5065	5070
Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu	5075	5080	5085

Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Gly Val Asp
 5090 5095 5100
 Thr Ile Cys Thr His Arg Val Asp Pro Ile Gly Pro Gly Leu Asp
 5105 5110 5115
 Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Ser Ile
 5120 5125 5130
 Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val
 5135 5140 5145
 Asn Gly Phe Asn Pro Trp Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro
 5150 5155 5160
 Gly Thr Ser Thr Val His Leu Ala Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser
 5165 5170 5175
 Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Val Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr
 5180 5185 5190
 Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln
 5195 5200 5205
 His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln
 5210 5215 5220
 Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly Pro Leu
 5225 5230 5235
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys His Gly
 5240 5245 5250
 Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr Leu Arg Leu Asp Pro
 5255 5260 5265
 Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser
 5270 5275 5280
 Gln Leu Thr Asn Ser Val Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp
 5285 5290 5295
 Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val
 5300 5305 5310
 Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Ser Ala Val His Leu Glu Thr
 5315 5320 5325
 Ser Gly Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Gly Pro
 5330 5335 5340
 Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln
 5345 5350 5355
 Tyr Glu Glu Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr
 5360 5365 5370
 Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser
 5375 5380 5385
 Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu

5390										5395					5400				
Arg	Pro	Glu	Lys	Arg	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Thr	Ile	Cys					
5405										5410					5415				
Thr	His	Arg	Leu	Asp	Pro	Leu	Asn	Pro	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Gln					
5420										5425					5430				
Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Leu					
5435										5440					5445				
Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe					
5450										5455					5460				
Thr	His	Arg	Asn	Phe	Val	Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser					
5465										5470					5475				
Thr	Val	His	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Arg					
5480										5485					5490				
Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe					
5495										5500					5505				
Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	Tyr	Glu	Glu	Ala	Met	Arg	His	Pro	Gly					
5510										5515					5520				
Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu					
5525										5530					5535				
Arg	Pro	Leu	Phe	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ser	Ser					
5540										5545					5550				
Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	Asp	Lys	Ala	Ala	Thr					
5555										5560					5565				
Arg	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	Thr	His	His	Pro	Asp	Pro	Gln	Ser	Pro					
5570										5575					5580				
Gly	Leu	Asn	Arg	Glu	Gln	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr					
5585										5590					5595				
His	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser					
5600										5605					5610				
Leu	Tyr	Val	Asp	Gly	Phe	Thr	His	Trp	Ser	Pro	Ile	Pro	Thr	Thr					
5615										5620					5625				
Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Ile	Val	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ile					
5630										5635					5640				
Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Pro	Leu	Leu	Val					
5645										5650					5655				
Pro	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	Tyr	Glu	Glu					
5660										5665					5670				
Asn	Met	Gly	His	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Ile	Thr	Glu	Ser					
5675										5680					5685				
Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu	Phe	Lys	Ser	Thr	Ser	Val					
5690										5695					5700				

Gly Pro Leu Tyr Ser	Gly Cys Arg Leu Thr	Leu Leu Arg Pro Glu
5705	5710	5715
Lys Asp Gly Val Ala Thr	Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg	
5720	5725	5730
Pro Asp Pro Lys Ile	Pro Gly Leu Asp Arg Gln Gln Leu Tyr Trp	
5735	5740	5745
Glu Leu Ser Gln Leu Thr	His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr	
5750	5755	5760
Thr Leu Asp Arg Asp Ser	Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg	
5765	5770	5775
Ser Ser Val Pro Thr Thr	Ser Thr Pro Gly Thr Phe Thr Val Gln	
5780	5785	5790
Pro Glu Thr Ser Glu Thr	Pro Ser Ser Leu Pro Gly Pro Thr Ala	
5795	5800	5805
Thr Gly Pro Val Leu Leu	Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ile	
5810	5815	5820
Asn Leu Gln Tyr Glu Glu	Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys	
5825	5830	5835
Phe Asn Thr Thr Glu Arg	Val Leu Gln Gly Leu Leu Met Pro Leu	
5840	5845	5850
Phe Lys Asn Thr Ser Val	Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu	
5855	5860	5865
Thr Leu Leu Arg Pro Glu	Lys Asp Gly Ala Ala Thr Arg Val Asp	
5870	5875	5880
Ala Val Cys Thr His Arg	Pro Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asp	
5885	5890	5895
Arg Glu Arg Leu Tyr Trp	Lys Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile	
5900	5905	5910
Thr Glu Leu Gly Pro Tyr	Thr Leu Asp Arg His Ser Leu Tyr Val	
5915	5920	5925
Asn Gly Phe Thr His Gln	Ser Ser Met Thr Thr Thr Arg Thr Pro	
5930	5935	5940
Asp Thr Ser Thr Met His	Leu Ala Thr Ser Arg Thr Pro Ala Ser	
5945	5950	5955
Leu Ser Gly Pro Thr Thr	Ala Ser Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr	
5960	5965	5970
Ile Asn Phe Thr Ile Thr	Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met His	
5975	5980	5985
His Pro Gly Ser Arg Lys	Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln	
5990	5995	6000

Gly Leu Leu Arg Pro Val Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu	6005	6010	6015
Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Lys Lys Asp Gly	6020	6025	6030
Ala Ala Thr Lys Val Asp Ala Ile Cys Thr Tyr Arg Pro Asp Pro	6035	6040	6045
Lys Ser Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser	6050	6055	6060
Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp	6065	6070	6075
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg Ser Ser Val	6080	6085	6090
Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Pro Thr Val Asp Leu Gly Thr	6095	6100	6105
Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ser Pro	6110	6115	6120
Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg	6125	6130	6135
Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr	6140	6145	6150
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Ser Leu Phe Lys Ser	6155	6160	6165
Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu	6170	6175	6180
Arg Pro Glu Lys Asp Gly Thr Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys	6185	6190	6195
Thr His His Pro Asp Pro Lys Ser Pro Arg Leu Asp Arg Glu Gln	6200	6205	6210
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu	6215	6220	6225
Gly Pro Tyr Ala Leu Asp Asn Asp Ser Leu Phe Val Asn Gly Phe	6230	6235	6240
Thr His Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro	6245	6250	6255
Thr Val Tyr Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly	6260	6265	6270
Pro Ser Ala Ala Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe	6275	6280	6285
Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser	6290	6295	6300
Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg			

6305	6310	6315
Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys		
6320	6325	6330
Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly		
6335	6340	6345
Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly		
6350	6355	6360
Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His		
6365	6370	6375
Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu		
6380	6385	6390
Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser		
6395	6400	6405
Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile		
6410	6415	6420
Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu		
6425	6430	6435
Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro		
6440	6445	6450
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg		
6455	6460	6465
Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val		
6470	6475	6480
Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu		
6485	6490	6495
Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly		
6500	6505	6510
Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr		
6515	6520	6525
Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr		
6530	6535	6540
Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr		
6545	6550	6555
Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr		
6560	6565	6570
Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala		
6575	6580	6585
Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro		
6590	6595	6600
Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln		
6605	6610	6615

Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val		
6620	6625	6630
Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu		
6635	6640	6645
Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly		
6650	6655	6660
Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe		
6665	6670	6675
Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr		
6680	6685	6690
Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp		
6695	6700	6705
Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp		
6710	6715	6720
Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe		
6725	6730	6735
Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val		
6740	6745	6750
Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val		
6755	6760	6765
Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp		
6770	6775	6780
Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met		
6785	6790	6795
Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His		
6800	6805	6810
Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp		
6815	6820	6825
Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn		
6830	6835	6840
Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys		
6845	6850	6855
Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro		
6860	6865	6870
Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro		
6875	6880	6885
Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu		
6890	6895	6900
Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp		
6905	6910	6915

EP2489364B1

Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
6920 6925 6930

Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu
6935 6940 6945

Ile Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys
6950 6955 6960

Gly Val Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr
6965 6970 6975

Asn Val Gln Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp
6980 6985 6990

Leu Glu Asp Leu Gln
6995

<210> 5

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met	Ala	Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Cys	Gly	Thr	1	5	10	15
Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	20	25	30	
Val	Gln	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Gly	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Ala	35	40	45	
Ala	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Asn	Ile	Ser	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Pro	Arg	Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Pro	Cys	Ala	Glu	Val	Ser	65	70	75	
Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	80	85	90	
Gln	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Arg	Cys	Leu	Ala	95	100	105	
His	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Pro	Glu	Asp	Leu	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	110	115	120	
Asp	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Asn	Pro	Asp	Ala	Phe	Ser	Gly	Pro	Gln	125	130	135	
Ala	Cys	Thr	Arg	Phe	Phe	Ser	Arg	Ile	Thr	Lys	Ala	Asn	Val	Asp	140	145	150	
Leu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Arg	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Ala	155	160	165	
Ala	Leu	Ala	Cys	Trp	Gly	Val	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	170	175	180	
Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Cys	Asp	Leu	Pro	Gly	Arg				

185										190					195				
Phe	Val	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Ser					
				200										210					
Cys	Pro	Gly	Pro	Leu	Asp	Gln	Asp	Gln	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala					
				215										225					
Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp					
				230										240					
Ser	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu					
				245										255					
Gly	Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala					
				260										270					
Trp	Arg	Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu					
				275										285					
Arg	Thr	Ile	Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr					
				290										300					
Ala	Cys	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu					
				305										315					
Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys	Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala					
				320										330					
Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr					
				335										345					
Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr					
				350										360					
Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val	Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu					
				365										375					
Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile	Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr					
				380										390					
Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Val	Asn	Lys	Gly	His					
				395										405					
Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg	Phe	Val	Lys					
				410										420					
Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Thr	Ala					
				425										435					
Phe	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Ser					
				440										450					
Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu					
				455										465					
Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala					
				470										480					
Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys					
				485										495					

Ile	Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	500	505	510
Leu	Ser	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Met	Lys	515	520	525
Leu	Arg	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Gln	530	535	540
Lys	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Glu	Glu	Arg	545	550	555
His	Arg	Pro	Val	Arg	Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Asp	Asp	560	565	570
Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	Gly	Ile	Pro	Asn	Gly	575	580	585
Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Met	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr	590	595	600
Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	605	610	615
Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala									620		

<210> 6

<211> 690

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Ala	Pro	Trp	Pro	Glu	Leu	Gly	Asp	Ala	Gln	Pro	Asn	Pro	Asp	
1				5					10					15	
Lys	Tyr	Leu	Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Gln	Gln	Pro	Thr	Ala	Pro	Asp	
				20					25					30	
Lys	Ser	Lys	Glu	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Asn	Thr	Glu	Ala	Pro	Val	
				35					40					45	
Thr	Lys	Ile	Glu	Leu	Leu	Pro	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ala	Thr	Leu	Ile	
				50					55					60	
Asp	Glu	Pro	Thr	Glu	Val	Asp	Asp	Pro	Trp	Asn	Leu	Pro	Thr	Leu	
				65					70					75	
Gln	Asp	Ser	Gly	Ile	Lys	Trp	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Lys	Gly	Lys	
				80					85					90	
Ile	Leu	Cys	Phe	Phe	Gln	Gly	Ile	Gly	Arg	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	
				95					100					105	
Gly	Phe	Leu	Tyr	Phe	Phe	Val	Cys	Ser	Leu	Asp	Ile	Leu	Ser	Ser	
				110					115					120	
Ala	Phe	Gln	Leu	Val	Gly	Gly	Lys	Met	Ala	Gly	Gln	Phe	Phe	Ser	
				125					130					135	

Asn	Ser	Ser	Ile	Met	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Ile	Gly		140	145	150
Val	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser		155	160	165
Ile	Val	Val	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Ala		170	175	180
Ala	Ile	Pro	Ile	Ile	Met	Gly	Ala	Asn	Ile	Gly	Thr	Ser	Ile	Thr		185	190	195
Asn	Thr	Ile	Val	Ala	Leu	Met	Gln	Val	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Phe		200	205	210
Arg	Arg	Ala	Phe	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	His	Asp	Phe	Phe	Asn	Trp		215	220	225
Leu	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Glu	Val	Ala	Thr	His	Tyr		230	235	240
Leu	Glu	Ile	Ile	Thr	Gln	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Phe	His	Phe	Lys		245	250	255
Asn	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	Ile	Thr	Lys	Pro		260	265	270
Phe	Thr	Lys	Leu	Ile	Val	Gln	Leu	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Ser	Gln		275	280	285
Ile	Ala	Met	Asn	Asp	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Lys	Ser	Leu	Val	Lys		290	295	300
Ile	Trp	Cys	Lys	Thr	Phe	Thr	Asn	Lys	Thr	Gln	Ile	Asn	Val	Thr		305	310	315
Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Asn	Cys	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Cys	Trp	Thr		320	325	330
Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Trp	Thr	Met	Lys	Asn	Val	Thr	Tyr	Lys	Glu		335	340	345
Asn	Ile	Ala	Lys	Cys	Gln	His	Ile	Phe	Val	Asn	Phe	His	Leu	Pro		350	355	360
Asp	Leu	Ala	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Val		365	370	375
Leu	Cys	Gly	Cys	Leu	Ile	Met	Ile	Val	Lys	Ile	Leu	Gly	Ser	Val		380	385	390
Leu	Lys	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Lys	Thr	Ile	Asn	Thr		395	400	405
Asp	Phe	Pro	Phe	Pro	Phe	Ala	Trp	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ile		410	415	420
Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Thr	Phe	Ile	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Val		425	430	435
Phe	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Thr				

				440					445				450
Ile	Glu	Arg	Ala	Tyr	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly
				455					460				465
Thr	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Asn
				470					475				480
Leu	Arg	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Cys	His	Phe	Phe	Phe
				485					490				495
Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Tyr	Pro	Ile	Pro	Phe	Thr	Arg
				500					505				510
Pro	Ile	Arg	Met	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Lys
				515					520				525
Arg	Trp	Phe	Ala	Val	Phe	Tyr	Leu	Ile	Ile	Phe	Phe	Phe	Leu
				530					535				540
Pro	Leu	Thr	Val	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Gly	Trp	Arg	Val
				545					550				555
Val	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Ile	Leu	Val
				560					565				570
Cys	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ser	Arg	Cys	Pro	Arg	Val	Leu	Pro
				575					580				585
Lys	Leu	Gln	Asn	Trp	Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Arg	Ser
				590					595				600
Lys	Pro	Trp	Asp	Ala	Val	Val	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Cys	Phe
				605					610				615
Met	Arg	Cys	Cys	Tyr	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Cys	Arg	Ala	Cys
				620					625				630
Leu	Leu	Cys	Gly	Cys	Pro	Lys	Cys	Cys	Arg	Cys	Ser	Lys	Cys
				635					640				645
Glu	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Glu	Gly	Gln	Asp	Val	Pro	Val
				650					655				660
Ala	Pro	Glu	Thr	Phe	Asp	Asn	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Ala
				665					670				675
Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Ser	Asp	Ser	Lys	Thr	Glu	Cys	Thr	Ala
				680					685				690

<210> 7

<211> 1093

<212> PRT

<213> Homo sapiens

EP2489364B1

<400> 7

Met	Val	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser
1				5					10					15
Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Ser	His	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30

Ser	Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	His	35	40	45
Pro	Thr	Val	Ala	Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	Val	Ser	Asn	Phe	50	55	60
Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Asp	Phe	Ser	Gln	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	65	70	75
Ser	Gly	Asn	Gln	Leu	Ile	Val	Gly	Ala	Arg	Asn	Tyr	Leu	Phe	Arg	80	85	90
Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Thr	Glu	Trp	Ala	95	100	105
Ser	Ser	Glu	Asp	Thr	Arg	Arg	Ser	Cys	Gln	Ser	Lys	Gly	Lys	Thr	110	115	120
Glu	Glu	Glu	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Ala	Gly	125	130	135
Arg	Lys	Val	Phe	Met	Cys	Gly	Thr	Asn	Ala	Phe	Ser	Pro	Met	Cys	140	145	150
Thr	Ser	Arg	Gln	Val	Gly	Asn	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Glu	Lys	Ile	155	160	165
Asn	Gly	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Tyr	Asp	Pro	Arg	His	Asn	Ser	Thr	170	175	180
Ala	Val	Ile	Ser	Ser	Gln	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Val	Ile	185	190	195
Asp	Phe	Ser	Gly	Arg	Asp	Pro	Ala	Ile	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	200	205	210
Gly	Pro	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Tyr	Asn	Ser	Lys	Trp	Leu	Asn	215	220	225
Glu	Pro	Asn	Phe	Val	Ala	Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	230	235	240
Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Val	Glu	His	Asp	Cys	Gly	Arg	Thr	245	250	255
Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Cys	Lys	Asn	Asp	Val	Gly	Gly	260	265	270
Arg	Phe	Leu	Leu	Glu	Asp	Thr	Trp	Thr	Thr	Phe	Met	Lys	Ala	Arg	275	280	285
Leu	Asn	Cys	Ser	Arg	Pro	Gly	Glu	Val	Pro	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Glu	290	295	300
Leu	Gln	Ser	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gly	305	310	315
Val	Phe	Thr	Thr	Asn	Val	Asn	Ser	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Cys	320	325	330

Ala	Phe	Asn	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Gln	Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Phe	
				335					340					345	
Arg	Tyr	Gln	Glu	Asn	Pro	Arg	Ala	Ala	Trp	Leu	Pro	Ile	Ala	Asn	
				350					355					360	
Pro	Ile	Pro	Asn	Phe	Gln	Cys	Gly	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Gly	Pro	
				365					370					375	
Asn	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Ala	Gln	Arg	Leu	
				380					385					390	
Phe	Leu	Met	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Val	Thr	Pro	Glu	Pro	Cys	
				395					400					405	
Val	Thr	Gln	Asp	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	His	Leu	Val	Val	Asp	Leu	
				410					415					420	
Val	Gln	Ala	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	His	Val	Leu	Tyr	Ile	Gly	Thr	
				425					430					435	
Glu	Ser	Gly	Thr	Ile	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Arg	Ser	
				440					445					450	
Leu	His	Gly	Cys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Leu	His	Val	Leu	Pro	Pro	Gly	
				455					460					465	
Arg	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ile	Leu	His	Ser	Ala	Arg	
				470					475					480	
Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Leu	Arg	Asp	Gly	Val	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	
				485					490					495	
Glu	Arg	Cys	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Gln	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Ala	
				500					505					510	
Arg	Asp	Pro	Tyr	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Lys	Gln	Gln	Arg	Cys	Ser	
				515					520					525	
Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Ser	Leu	Trp	Thr	Gln	Asn	Ile	
				530					535					540	
Thr	Ala	Cys	Pro	Val	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Phe	Gly	
				545					550					555	
Pro	Trp	Ser	Pro	Trp	Gln	Pro	Cys	Glu	His	Leu	Asp	Gly	Asp	Asn	
				560					565					570	
Ser	Gly	Ser	Cys	Leu	Cys	Arg	Ala	Arg	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Arg	
				575					580					585	
Pro	Arg	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Cys	Leu	Gly	Pro	Ala	Ile	His	Ile	
				590					595					600	
Ala	Asn	Cys	Ser	Arg	Asn	Gly	Ala	Trp	Thr	Pro	Trp	Ser	Ser	Trp	
				605					610					615	
Ala	Leu	Cys	Ser	Thr	Ser	Cys	Gly	Ile	Gly	Phe	Gln	Val	Arg	Gln	
				620					625					630	
Arg	Ser	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Arg	His	Gly	Gly	Arg	Ile	Cys	

635										640					645				
Val	Gly	Lys	Ser	Arg	Glu	Glu	Arg	Phe	Cys	Asn	Glu	Asn	Thr	Pro					
				650					655					660					
Cys	Pro	Val	Pro	Ile	Phe	Trp	Ala	Ser	Trp	Gly	Ser	Trp	Ser	Lys					
				665					670					675					
Cys	Ser	Ser	Asn	Cys	Gly	Gly	Gly	Met	Gln	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala					
				680					685					690					
Cys	Glu	Asn	Gly	Asn	Ser	Cys	Leu	Gly	Cys	Gly	Val	Glu	Phe	Lys					
				695					700					705					
Thr	Cys	Asn	Pro	Glu	Gly	Cys	Pro	Glu	Val	Arg	Arg	Asn	Thr	Pro					
				710					715					720					
Trp	Thr	Pro	Trp	Leu	Pro	Val	Asn	Val	Thr	Gln	Gly	Gly	Ala	Arg					
				725					730					735					
Gln	Glu	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Pro	Leu	Ala	Asp					
				740					745					750					
Pro	His	Gly	Leu	Gln	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Thr	Arg	Thr					
				755					760					765					
Cys	Pro	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Thr	Asp	Ala	Leu	Val					
				770					775					780					
Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Pro	His	Thr	Val	Ser					
				785					790					795					
Gly	Gly	Trp	Ala	Ala	Trp	Gly	Pro	Trp	Ser	Ser	Cys	Ser	Arg	Asp					
				800					805					810					
Cys	Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Cys	Thr	Asn	Pro					
				815					820					825					
Glu	Pro	Arg	Asn	Gly	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu					
				830					835					840					
Tyr	Gln	Asp	Cys	Asn	Pro	Gln	Ala	Cys	Pro	Val	Arg	Gly	Ala	Trp					
				845					850					855					
Ser	Cys	Trp	Thr	Ser	Trp	Ser	Pro	Cys	Ser	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly					
				860					865					870					
Gly	His	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	Cys	Thr	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser					
				875					880					885					
Pro	Gly	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Leu	His	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu					
				890					895					900					
Cys	Ala	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Glu					
				905					910					915					
Trp	Ser	Lys	Cys	Thr	Asp	Asp	Gly	Ala	Gln	Ser	Arg	Ser	Arg	His					
				920					925					930					
Cys	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Ser					
				935					940					945					

Ser	Gln	Ser	Arg	Pro	Cys	Pro	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Ile	Leu	950	955	960
Pro	Ala	Ser	Ser	Met	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Phe	Asn	965	970	975
Leu	Ile	His	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Ser	Cys	Phe	Leu	Gly	Ser	980	985	990
Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Tyr	Leu	Ser	Cys	Gln	His	Cys	Gln	995	1000	1005
Arg	Gln	Ser	Gln	Glu	Ser	Thr	Leu	Val	His	Pro	Ala	Thr	Pro	Asn	1010	1015	1020
His	Leu	His	Tyr	Lys	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Lys	Asn	Glu	Lys	Tyr	1025	1030	1035
Thr	Pro	Met	Glu	Phe	Lys	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Leu	Ile	Pro	1040	1045	1050
Asp	Asp	Arg	Ala	Asn	Phe	Tyr	Pro	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Val	Tyr	1055	1060	1065
Thr	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Pro	Leu	Asn	Lys	His	Ser	Phe	Arg	1070	1075	1080
Pro	Glu	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Cys	Phe	Pro	Asn	Ser			1085	1090	

<210> 8

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met	Trp	Val	Leu	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr	Phe	Cys	Gly	Leu	Phe	Leu	1	5	10	15
Leu	Pro	Gly	Phe	Ala	Leu	Gln	Ile	Gln	Cys	Tyr	Gln	Cys	Glu	Glu	20	25	30	
Phe	Gln	Leu	Asn	Asn	Asp	Cys	Ser	Ser	Pro	Glu	Phe	Ile	Val	Asn	35	40	45	
Cys	Thr	Val	Asn	Val	Gln	Asp	Met	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Met	Glu	50	55	60	
Gln	Ser	Ala	Gly	Ile	Met	Tyr	Arg	Lys	Ser	Cys	Ala	Ser	Ser	Ala	65	70	75	
Ala	Cys	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Gly	Tyr	Gln	Ser	Phe	Cys	Ser	Pro	80	85	90	
Gly	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Cys	Ile	Ser	Cys	Cys	Asn	Thr	Pro	Leu	95	100	105	
Cys	Asn	Gly	Pro	Arg	Pro	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	110	115	120	
Leu	Arg	Pro	Gly	Leu	Arg	Thr	Thr	Ile	Leu	Phe	Leu	Lys	Leu	Ala	125	130	135	
Leu	Phe	Ser	Ala	His	Cys	140												

<210> 9

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Gln	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Cys	Gly	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Leu		1	5	10	15
Val	Leu	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Arg	Ile	Trp	Gly	Glu	Glu	Arg	Gly		20	25	30	
Phe	Pro	Pro	Asp	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	Glu	Ile		35	40	45	
Met	Thr	Pro	Pro	Thr	Lys	Thr	Leu	Trp	Pro	Lys	Gly	Ser	Asn	Ala		50	55	60	
Ser	Leu	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Val	Pro	Lys	Gly	Asp		65	70	75	
Arg	Thr	Ala	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Thr	Ile	Ser	Pro	Pro	Pro	Cys		80	85	90	
Gln	Gly	Pro	Ile	Glu	Ile	Lys	Glu	Thr	Phe	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr		95	100	105	
Val	Val	Ser	Cys	Leu	Val	Phe	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Ser		110	115	120	
Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Gly		125	130	135	
Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	His		140	145	150	
Ile	Val	Ile	Asp	Ile	Pro	Ile	Asn	Val	Tyr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu		155	160	165	
Asp	Trp	Pro	Phe	Gly	Ala	Glu	Met	Cys	Lys	Leu	Val	Pro	Phe	Ile		170	175	180	
Gln	Lys	Ala	Ser	Val	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu		185	190	195	
Ser	Ile	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Val	Ala	Ser	Trp	Ser	Arg	Ile	Lys		200	205	210	
Gly	Ile	Gly	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Ala	Val	Glu	Ile	Val	Leu	Ile		215	220	225	
Trp	Val	Val	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Ile	Gly	Phe		230	235	240	
Asp	Ile	Ile	Thr	Met	Asp	Tyr	Lys	Gly	Ser	Tyr	Leu	Arg	Ile	Cys					

				245					250					255
Leu	Leu	His	Pro	Val	Gln	Lys	Thr	Ala	Phe	Met	Gln	Phe	Tyr	Lys
				260					265					270
Thr	Ala	Lys	Asp	Trp	Trp	Leu	Phe	Ser	Phe	Tyr	Phe	Cys	Leu	Pro
				275					280					285
Leu	Ala	Ile	Thr	Ala	Phe	Phe	Tyr	Thr	Leu	Met	Thr	Cys	Glu	Met
				290					295					300
Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Gly	Met	Gln	Ile	Ala	Leu	Asn	Asp	His	Leu
				305					310					315
Lys	Gln	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Lys	Thr	Val	Phe	Cys	Leu	Val	Leu
				320					325					330
Val	Phe	Ala	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Ser	Arg	Ile	Leu
				335					340					345
Lys	Leu	Thr	Leu	Tyr	Asn	Gln	Asn	Asp	Pro	Asn	Arg	Cys	Glu	Leu
				350					355					360
Leu	Ser	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Asp	Tyr	Ile	Gly	Ile	Asn	Met	Ala
				365					370					375
Ser	Leu	Asn	Ser	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Ser
				380					385					390
Lys	Arg	Phe	Lys	Asn	Cys	Phe	Lys	Ser	Cys	Leu	Cys	Cys	Trp	Cys
				395					400					405
Gln	Ser	Phe	Glu	Glu	Lys	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Gln	Ser	Cys
				410					415					420
Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp	His	Gly	Tyr	Asp	Asn	Phe	Arg	Ser
				425					430					435
Ser	Asn	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser								
				440										

<210> 10

<211> 783

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Ser	Gly	Gly	His	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	Trp	Pro	Trp
1				5					10					15
Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu
				20					25					30
Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Ser	Glu	Arg	Ser	Ala	Glu	Gln	Lys
				35					40					45
Ala	Ile	Ile	Arg	Val	Ile	Pro	Leu	Lys	Met	Asp	Pro	Thr	Gly	Lys
				50					55					60
Leu	Asn	Leu	Thr	Leu	Glu	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Ala	Glu	Ile
				65					70					75

Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Lys	Leu	Met	Gln	Ser	His	Pro	Leu	Tyr	Leu	80	85	90
Cys	Asn	Ala	Ser	Asp	Asp	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Gly	Phe	Ile	Ser	95	100	105
Ile	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Pro	Arg	Arg	Ala	Pro	Arg	Pro	Cys	Leu	110	115	120
Ser	Leu	Ala	Ser	Lys	Ala	Arg	Met	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	125	130	135
Ala	Val	Leu	Phe	Asp	Ile	Thr	Glu	Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	140	145	150
Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Trp	155	160	165
Gly	Asn	Asp	Ala	Glu	Lys	Leu	Met	Glu	Phe	Val	Tyr	Lys	Asn	Gln	170	175	180
Lys	Ala	His	Val	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Trp	Pro	185	190	195
Asp	Tyr	Asp	Val	Trp	Ile	Leu	Met	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Ile	Phe	200	205	210
Val	Ile	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Arg	Cys	Arg	Pro	Arg	215	220	225
His	Ser	Arg	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln	Gln	Arg	Thr	Ala	Trp	Ala	Ile	230	235	240
Ser	Gln	Leu	Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Gln	Ala	Ser	Cys	Arg	Gln	Ala	245	250	255
Arg	Gly	Glu	Trp	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Ala	Pro	260	265	270
Val	Cys	Ala	Ile	Cys	Leu	Glu	Glu	Phe	Ser	Glu	Gly	Gln	Glu	Leu	275	280	285
Arg	Val	Ile	Ser	Cys	Leu	His	Glu	Phe	His	Arg	Asn	Cys	Val	Asp	290	295	300
Pro	Trp	Leu	His	Gln	His	Arg	Thr	Cys	Pro	Leu	Cys	Val	Phe	Asn	305	310	315
Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Ser	Phe	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Arg	320	325	330
Ser	Tyr	Gln	Glu	Pro	Gly	Arg	Arg	Leu	His	Leu	Ile	Arg	Gln	His	335	340	345
Pro	Gly	His	Ala	His	Tyr	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Gly	350	355	360
Pro	Ser	Arg	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Gly	Pro	Phe	365	370	375

Leu	Pro	Ser	Gln	Glu	Pro	Gly	Met	Gly	Pro	Arg	His	His	Arg	Phe	380	385	390
Pro	Arg	Ala	Ala	His	Pro	Arg	Ala	Pro	Gly	Glu	Gln	Gln	Arg	Leu	395	400	405
Ala	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Trp	Gly	Met	Ser	His	410	415	420
Leu	Gln	Ser	Thr	Ser	Gln	His	Pro	Ala	Ala	Cys	Pro	Val	Pro	Leu	425	430	435
Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Tyr	440	445	450
Cys	Thr	Glu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Ser	Asp	455	460	465
Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Cys	His	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Val	Val	470	475	480
Asn	Cys	Thr	Asp	Ile	Ser	Leu	Gln	Gly	Val	His	Gly	Ser	Ser	Ser	485	490	495
Thr	Phe	Cys	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Phe	Asp	Pro	Leu	Val	Tyr	500	505	510
Cys	Ser	Pro	Lys	Gly	Asp	Pro	Gln	Arg	Val	Asp	Met	Gln	Pro	Ser	515	520	525
Val	Thr	Ser	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Thr	Gly	530	535	540
Glu	Thr	Gln	Val	Ser	Ser	His	Val	His	Tyr	His	Arg	His	Arg	His	545	550	555
His	His	Tyr	Lys	Lys	Arg	Phe	Gln	Trp	His	Gly	Arg	Lys	Pro	Gly	560	565	570
Pro	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Ile	Pro	Arg	Thr	575	580	585
Gln	Pro	Gln	Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Thr	Gly	590	595	600
Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gln	Cys	605	610	615
Pro	Arg	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Ser	620	625	630
Ser	Ile	Cys	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Phe	Asn	Leu	Gln	Lys	Ser	635	640	645
Ser	Leu	Ser	Ala	Arg	His	Pro	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Gly	Gly	Pro	650	655	660
Ser	Glu	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	Val	His	665	670	675
Pro	Ala	Cys	Gln	Ile	Phe	Pro	His	Tyr	Thr	Pro	Ser	Val	Ala	Tyr			

				680					685					690
Pro	Trp	Ser	Pro	Glu	Ala	His	Pro	Leu	Ile	Cys	Gly	Pro	Pro	Gly
				695					700					705
Leu	Asp	Lys	Arg	Leu	Leu	Pro	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Ser
				710					715					720
Asn	Ser	Gln	Pro	Val	Trp	Leu	Cys	Leu	Thr	Pro	Arg	Gln	Pro	Leu
				725					730					735
Glu	Pro	His	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Glu	Trp	Ser	Ser	Asp
				740					745					750
Thr	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	His	Cys	Gln	Val	Leu
				755					760					765
Ser	Ala	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Cys	Glu
				770					775					780
Gln	Ala	Val												

<210> 11

<211> 490

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met	Glu	Ser	Ile	Ser	Met	Met	Gly	Ser	Pro	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Val	Leu	Pro	Asn	Gly	Ile	Asn	Gly	Ile	Lys	Asp	Ala	Arg	Lys	20	25	30	
Val	Thr	Val	Gly	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Asp	Phe	Ala	Lys	Ser	Leu	35	40	45	
Thr	Ile	Arg	Leu	Ile	Arg	Cys	Gly	Tyr	His	Val	Val	Ile	Gly	Ser	50	55	60	
Arg	Asn	Pro	Lys	Phe	Ala	Ser	Glu	Phe	Phe	Pro	His	Val	Val	Asp	65	70	75	
Val	Thr	His	His	Glu	Asp	Ala	Leu	Thr	Lys	Thr	Asn	Ile	Ile	Phe	80	85	90	
Val	Ala	Ile	His	Arg	Glu	His	Tyr	Thr	Ser	Leu	Trp	Asp	Leu	Arg	95	100	105	
His	Leu	Leu	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Ile	Asp	Val	Ser	Asn	Asn	Met	110	115	120	
Arg	Ile	Asn	Gln	Tyr	Pro	Glu	Ser	Asn	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	125	130	135	
Leu	Phe	Pro	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Phe	Asn	Val	Val	Ser	140	145	150	
Ala	Trp	Ala	Leu	Gln	Leu	Gly	Pro	Lys	Asp	Ala	Ser	Arg	Gln	Val	155	160	165	

Tyr	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	Ile	Gln	Ala	Arg	Gln	Gln	Val	Ile	Glu	170	175	180
Leu	Ala	Arg	Gln	Leu	Asn	Phe	Ile	Pro	Ile	Asp	Leu	Gly	Ser	Leu	185	190	195
Ser	Ser	Ala	Arg	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Phe	Thr	200	205	210
Leu	Trp	Arg	Gly	Pro	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Thr	Phe	215	220	225
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Val	Ile	His	Pro	Tyr	Ala	230	235	240
Arg	Asn	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Glu	Ile	Val	245	250	255
Asn	Lys	Thr	Leu	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	260	265	270
Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Gly	275	280	285
Thr	Lys	Tyr	Arg	Arg	Phe	Pro	Pro	Trp	Leu	Glu	Thr	Trp	Leu	Gln	290	295	300
Cys	Arg	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Met	Val	305	310	315
His	Val	Ala	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	320	325	330
Tyr	Leu	Phe	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Gln	Gln	Val	His	Ala	Asn	Ile	335	340	345
Glu	Asn	Ser	Trp	Asn	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Arg	Ile	Glu	Met	Tyr	350	355	360
Ile	Ser	Phe	Gly	Ile	Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	365	370	375
Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Trp	Arg	Glu	380	385	390
Phe	Ser	Phe	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Gly	Tyr	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	395	400	405
Ser	Thr	Phe	His	Val	Leu	Ile	Tyr	Gly	Trp	Lys	Arg	Ala	Phe	Glu	410	415	420
Glu	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Pro	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	425	430	435
Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Lys	Ile	Ile	Leu	Phe	440	445	450
Leu	Pro	Cys	Ile	Ser	Gln	Lys	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Gly	Trp	455	460	465

EP2489364B1

Glu Lys Ser Gln Phe Leu Glu Glu Gly Ile Gly Gly Thr Ile Pro
470 475 480

His Val Ser Pro Glu Arg Val Thr Val Met
485 490

<210> 12

<211> 1214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Ser	Trp	Ile	Pro	Lys	Ile	Phe
1				5					10					15
Lys	Lys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Phe	Ile	Val	Asp	Ser	Thr	Asp	Pro
				20					25					30
Gly	Gly	Thr	Leu	Cys	Gln	Cys	Gly	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	His	Pro
				35					40					45
Ala	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Thr	Val
				50					55					60
Trp	Asp	Ser	Asp	Ala	His	Thr	Thr	Glu	Lys	Pro	Thr	Asp	Ala	Tyr
				65					70					75
Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Ala	Gly	Arg	Lys	His	Ser	Asn	Phe
				80					85					90
Leu	Arg	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu
				95					100					105
Val	Thr	Arg	Thr	Trp	Gly	Phe	Arg	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Val	Ser
				110					115					120
Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Leu	Gln	Thr	Trp	Leu	Gln
				125					130					135
Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Ala	Gln	Ser	Thr	Gly
				140					145					150
Ala	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	His	Thr	Gly	Ile	Gly	Arg	His
				155					160					165
Val	Gly	Val	Ala	Val	Arg	Asp	His	Gln	Met	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly
				170					175					180
Thr	Lys	Val	Val	Ala	Met	Gly	Val	Ala	Pro	Trp	Gly	Val	Val	Arg
				185					190					195
Asn	Arg	Asp	Thr	Leu	Ile	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg
				200					205					210
Tyr	Arg	Trp	Arg	Gly	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	Phe	Pro	Leu
				215					220					225
Asp	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Val	Asp	Asp	Gly	Thr	His
				230					235					240
Gly	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser

245										250					255				
Tyr	Ile	Ser	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ile	Asp				
260										265					270				
Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Asp	Glu	Lys	Met	Leu					
275										280					285				
Thr	Arg	Ile	Glu	Asn	Ala	Thr	Gln	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Leu	Leu					
290										295					300				
Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Cys	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu					
305										310					315				
Glu	Asp	Thr	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Arg	Gln	Gly	Glu					
320										325					330				
Ala	Arg	Asp	Arg	Ile	Arg	Arg	Phe	Phe	Pro	Lys	Gly	Asp	Leu	Glu					
335										340					345				
Val	Leu	Gln	Ala	Gln	Val	Glu	Arg	Ile	Met	Thr	Arg	Lys	Glu	Leu					
350										355					360				
Leu	Thr	Val	Tyr	Ser	Ser	Glu	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Phe	Glu	Thr					
365										370					375				
Ile	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Cys	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala					
380										385					390				
Ser	Ala	Tyr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Trp	Asn	Arg					
395										400					405				
Val	Asp	Ile	Ala	Gln	Ser	Glu	Leu	Phe	Arg	Gly	Asp	Ile	Gln	Trp					
410										415					420				
Arg	Ser	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Met	Asp	Ala	Leu	Leu	Asn					
425										430					435				
Asp	Arg	Pro	Glu	Phe	Val	Arg	Leu	Leu	Ile	Ser	His	Gly	Leu	Ser					
440										445					450				
Leu	Gly	His	Phe	Leu	Thr	Pro	Met	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Tyr	Ser					
455										460					465				
Ala	Ala	Pro	Ser	Asn	Ser	Leu	Ile	Arg	Asn	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala					
470										475					480				
Ser	His	Ser	Ala	Gly	Thr	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Ala					
485										490					495				
Ala	Glu	Leu	Arg	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	His	Val	Leu	Arg	Met	Leu					
500										505					510				
Leu	Gly	Lys	Met	Cys	Ala	Pro	Arg	Tyr	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Trp					
515										520					525				
Asp	Pro	His	Pro	Gly	Gln	Gly	Phe	Gly	Glu	Ser	Met	Tyr	Leu	Leu					
530										535					540				
Ser	Asp	Lys	Ala	Thr	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	Gly	Leu	Gly					
545										550					555				

Gln	Ala	Pro	Trp	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Asn	
				560					565					570	
Arg	Ala	Gln	Met	Ala	Met	Tyr	Phe	Trp	Glu	Met	Gly	Ser	Asn	Ala	
				575					580					585	
Val	Ser	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Cys	Leu	Leu	Leu	Arg	Val	Met	Ala	
				590					595					600	
Arg	Leu	Glu	Pro	Asp	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Arg	Lys	Asp	Leu	
				605					610					615	
Ala	Phe	Lys	Phe	Glu	Gly	Met	Gly	Val	Asp	Leu	Phe	Gly	Glu	Cys	
				620					625					630	
Tyr	Arg	Ser	Ser	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	
				635					640					645	
Cys	Pro	Leu	Trp	Gly	Asp	Ala	Thr	Cys	Leu	Gln	Leu	Ala	Met	Gln	
				650					655					660	
Ala	Asp	Ala	Arg	Ala	Phe	Phe	Ala	Gln	Asp	Gly	Val	Gln	Ser	Leu	
				665					670					675	
Leu	Thr	Gln	Lys	Trp	Trp	Gly	Asp	Met	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Ile	
				680					685					690	
Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Phe	Cys	Pro	Pro	Leu	Ile	Tyr	Thr	
				695					700					705	
Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Pro	Thr	Arg	Glu	
				710					715					720	
Glu	Leu	Glu	Phe	Asp	Met	Asp	Ser	Val	Ile	Asn	Gly	Glu	Gly	Pro	
				725					730					735	
Val	Gly	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	
				740					745					750	
Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Arg	Cys	Gly	Gly	
				755					760					765	
Arg	Arg	Cys	Leu	Arg	Arg	Trp	Phe	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Val	
				770					775					780	
Thr	Ile	Phe	Met	Gly	Asn	Val	Val	Ser	Tyr	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	
				785					790					795	
Leu	Phe	Ser	Arg	Val	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Pro	Ala	Pro	Pro	
				800					805					810	
Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Phe	Trp	Ala	Phe	Thr	Leu	Leu	
				815					820					825	
Cys	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	
				830					835					840	
Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	
				845					850					855	

Leu Arg Leu Tyr	Leu Ala Asp Ser Trp Asn Gln Cys Asp Leu Val	860	865	870
Ala Leu Thr Cys	Phe Leu Leu Gly Val Gly Cys Arg Leu Thr Pro	875	880	885
Gly Leu Tyr His	Leu Gly Arg Thr Val Leu Cys Ile Asp Phe Met	890	895	900
Val Phe Thr Val	Arg Leu Leu His Ile Phe Thr Val Asn Lys Gln	905	910	915
Leu Gly Pro Lys	Ile Val Ile Val Ser Lys Met Met Lys Asp Val	920	925	930
Phe Phe Phe Leu	Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly	935	940	945
Val Ala Thr Glu	Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp Phe Pro	950	955	960
Ser Ile Leu Arg	Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe	965	970	975
Gly Gln Ile Pro	Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His	980	985	990
Ser Asn Cys Ser	Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly	995	1000	1005
Ala Gln Ala Gly	Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val	1010	1015	1020
Val Leu Leu Leu	Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu	1025	1030	1035
Val Asn Leu Leu	Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val	1040	1045	1050
Gln Gly Asn Ser	Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu	1055	1060	1065
Ile Arg Glu Phe	His Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile	1070	1075	1080
Val Ile Ser His	Leu Arg Leu Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg	1085	1090	1095
Pro Arg Ser Pro	Gln Pro Ser Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg	1100	1105	1110
Val Tyr Leu Ser	Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu	1115	1120	1125
Ser Val His Lys	Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg Ala Arg Asp Lys	1130	1135	1140
Arg Glu Ser Asp	Ser Glu Arg Leu Lys Arg Thr Ser Gln Lys Val	1145	1150	1155
Asp Leu Ala Leu	Lys Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr Glu Gln			

EP2489364B1

				1160						1165						1170
Arg	Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Arg	Glu	Val	Gln	Gln	Cys	Ser	Arg	Val		
				1175					1180							1185
Leu	Gly	Trp	Val	Ala	Glu	Ala	Leu	Ser	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro		
				1190					1195							1200
Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Asp			
				1205					1210							

```
<210> 13
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 13

Met	Asp	Cys	Arg	Lys	Met	Ala	Arg	Phe	Ser	Tyr	Ser	Val	Ile	Trp	1	5	10	15
Ile	Met	Ala	Ile	Ser	Lys	Val	Phe	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	20	25	30	
Leu	Gly	His	Gln	Glu	Phe	Ala	Arg	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ala	35	40	45	
Phe	Arg	Asp	Asp	Ser	Ile	Trp	Pro	Gln	Glu	Glu	Pro	Ala	Ile	Arg	50	55	60	
Pro	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Val	Pro	Pro	Met	Gly	Ile	Gln	His	Ser	65	70	75	
Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Thr	Cys	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Met	80	85	90	
Leu	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Pro	Pro	Ser	Phe	Tyr	Gly	Arg	Asn	95	100	105	
Cys	Glu	His	Asp	Val	Arg	Lys	Glu	Asn	Cys	Gly	Ser	Val	Pro	His	110	115	120	
Asp	Thr	Trp	Leu	Pro	Lys	Lys	Cys	Ser	Leu	Cys	Lys	Cys	Trp	His	125	130	135	
Gly	Gln	Leu	Arg	Cys	Phe	Pro	Gln	Ala	Phe	Leu	Pro	Gly	Cys	Asp	140	145	150	
Gly	Leu	Val	Met	Asp	Glu	His	Leu	Val	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	155	160	165	
Leu	Pro	Pro	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Thr	Phe	Met	Leu	Val	Gly	Ile	170	175	180	
Cys	Leu	Ser	Ile	Gln	Ser	Tyr	Tyr	185										

<210> 14

<211> 1033

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Val	Ala		1	5	10	15
Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu		20	25	30	
Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Thr		35	40	45	
Val	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu		50	55	60	
Lys	Ser	Leu	Leu	Cys	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Val	Asp	Gly	Thr	Trp		65	70	75	
Asp	Lys	Pro	Ala	Pro	Lys	Cys	Glu	Tyr	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ser	Ser		80	85	90	
Cys	Pro	Glu	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ile	Arg	Gly	Ser		95	100	105	
Thr	Pro	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Ala	Cys	Lys	Thr		110	115	120	
Asn	Phe	Ser	Met	Asn	Gly	Asn	Lys	Ser	Val	Trp	Cys	Gln	Ala	Asn		125	130	135	
Asn	Met	Trp	Gly	Pro	Thr	Arg	Leu	Pro	Thr	Cys	Val	Ser	Val	Phe		140	145	150	
Pro	Leu	Glu	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Met	Ile	His	Asn	Gly	His	His		155	160	165	
Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Ser	Val	Thr		170	175	180	
Tyr	Ser	Cys	Glu	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile		185	190	195	
Asn	Cys	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Pro	Thr	Cys		200	205	210	
Glu	Glu	Ala	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys		215	220	225	
Val	Lys	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Asn	Phe		230	235	240	
Phe	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Ser	Ser	Arg		245	250	255	
Cys	Val	Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Met	Pro	Val		260	265	270	
Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Cys	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Gly		275	280	285	
Arg	His	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ile		290	295	300	

Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asp	Pro	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Val	Asn	Phe		305	310	315
Ile	Leu	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Val	Asp	Ser	Gln		320	325	330
Lys	Thr	Gly	Thr	Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Cys	Glu	Leu	Ser		335	340	345
Thr	Ser	Ala	Val	Gln	Cys	Pro	His	Pro	Gln	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg		350	355	360
Met	Val	Ser	Gly	Gln	Lys	Asp	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val		365	370	375
Ile	Phe	Ala	Cys	Met	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ser	Lys	Gln		380	385	390
Ile	Arg	Cys	Asn	Ala	Gln	Gly	Thr	Trp	Glu	Pro	Ser	Ala	Pro	Val		395	400	405
Cys	Glu	Lys	Glu	Cys	Gln	Ala	Pro	Pro	Asn	Ile	Leu	Asn	Gly	Gln		410	415	420
Lys	Glu	Asp	Arg	His	Met	Val	Arg	Phe	Asp	Pro	Gly	Thr	Ser	Ile		425	430	435
Lys	Tyr	Ser	Cys	Asn	Pro	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Gly	Glu	Glu	Ser		440	445	450
Ile	Gln	Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Val	Trp	Thr	Pro	Pro	Val	Pro	Gln		455	460	465
Cys	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Leu	Leu	Thr		470	475	480
Lys	Pro	Gln	His	Gln	Phe	Val	Arg	Pro	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Cys		485	490	495
Gly	Glu	Gly	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Gln	Glu	Cys	Gln		500	505	510
Gly	Thr	Ile	Pro	Trp	Phe	Met	Glu	Ile	Arg	Leu	Cys	Lys	Glu	Ile		515	520	525
Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Tyr	Asn	Gly	Ala	His	Thr	Gly		530	535	540
Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr		545	550	555
Cys	Asn	Pro	Gly	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly		560	565	570
Glu	Ser	Thr	Ile	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Gly	Thr		575	580	585
Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Cys	Lys	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val		590	595	600
Gln	Cys	Ser	His	Val	His	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Ile	Ser	Gly				

605										610				615			
Lys	Glu	Ala	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Lys	Cys			
				620					625					630			
Tyr	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gln	Ile	Arg	Cys	Lys			
				635					640					645			
Ala	Asp	Asn	Thr	Trp	Asp	Pro	Glu	Ile	Pro	Val	Cys	Glu	Lys	Glu			
				650					655					660			
Thr	Cys	Gln	His	Val	Arg	Gln	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly			
				665					670					675			
Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Val	Asn	Thr	Ser	Cys	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gln			
				680					685					690			
Leu	Thr	Gly	His	Ala	Tyr	Gln	Met	Cys	Gln	Asp	Ala	Glu	Asn	Gly			
				695					700					705			
Ile	Trp	Phe	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Cys	Lys	Val	Ile	His	Cys	His			
				710					715					720			
Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Val	Asn	Gly	Lys	His	Thr	Gly	Met	Met	Ala			
				725					730					735			
Glu	Asn	Phe	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Tyr	Glu	Cys	Asp	Gln			
				740					745					750			
Gly	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Gln	Cys	Arg	Ser	Asp			
				755					760					765			
Ser	Lys	Gly	His	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Pro	Ser	Pro	Gln	Cys	Leu			
				770					775					780			
Arg	Ser	Pro	Pro	Val	Thr	Arg	Cys	Pro	Asn	Pro	Glu	Val	Lys	His			
				785					790					795			
Gly	Tyr	Lys	Leu	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Ala	Tyr	Ser	His	Asn	Asp			
				800					805					810			
Ile	Val	Tyr	Val	Asp	Cys	Asn	Pro	Gly	Phe	Ile	Met	Asn	Gly	Ser			
				815					820					825			
Arg	Val	Ile	Arg	Cys	His	Thr	Asp	Asn	Thr	Trp	Val	Pro	Gly	Val			
				830					835					840			
Pro	Thr	Cys	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Ile	Gly	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro			
				845					850					855			
Lys	Thr	Pro	Asn	Gly	Asn	His	Thr	Gly	Gly	Asn	Ile	Ala	Arg	Phe			
				860					865					870			
Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Ile	Leu	Tyr	Ser	Cys	Asp	Gln	Gly	Tyr	Leu			
				875					880					885			
Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Thr	His	Glu	Gly	Thr	Trp			
				890					895					900			
Ser	Gln	Pro	Ala	Pro	His	Cys	Lys	Glu	Val	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro			
				905					910					915			

Ala	Asp	Met	Asp	Gly	Ile	Gln	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	Arg	Lys	Met	920	925	930
Tyr	Gln	Tyr	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Gly	Tyr	935	940	945
Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro	Gln	Ser	Gln	Cys	Gln	Ser	Asp	His	Gln	950	955	960
Trp	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Val	Cys	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	965	970	975
Val	Leu	Cys	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	980	985	990
Ile	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Val	Ile	Ser	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Asn	995	1000	1005
Tyr	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ser	Gln	Lys	Glu	Ala	Phe	His	Leu	Glu	Ala	1010	1015	1020
Arg	Glu	Val	Tyr	Ser	Val	Asp	Pro	Tyr	Asn	Pro	Ala	Ser			1025	1030	

<210> 15

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val
 1          5          10          15

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg
          20          25          30

Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg
          35          40          45

Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
          50          55          60

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser
          65          70          75

Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys
          80          85          90

Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala
          95          100          105

Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr
          110          115          120

Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly
          125          130          135

Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln
          140          145          150

Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln
          155          160          165

Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu
          170          175          180

Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr
          185          190          195

Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
          200          205          210

Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His
          215          220          225

Pro Gly Gln Glu

```

<210> 16

<211> 508

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met	Leu	Leu	Trp	Ser	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Thr	Glu
1				5					10					15
Gln	Ala	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Ser	Val	Phe	Glu
				20					25					30
Gly	Asp	Ser	Ile	Val	Leu	Lys	Cys	Gln	Gly	Glu	Gln	Asn	Trp	Lys
				35					40					45
Ile	Gln	Lys	Met	Ala	Tyr	His	Lys	Asp	Asn	Lys	Glu	Leu	Ser	Val
				50					55					60
Phe	Lys	Lys	Phe	Ser	Asp	Phe	Leu	Ile	Gln	Ser	Ala	Val	Leu	Ser
				65					70					75
Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Phe	Cys	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Leu	Phe	Leu
				80					85					90
Trp	Asp	Lys	Thr	Ser	Asn	Ile	Val	Lys	Ile	Lys	Val	Gln	Glu	Leu
				95					100					105
Phe	Gln	Arg	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Phe	Gln	Pro	Ile	Glu
				110					115					120
Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Leu	Lys	Cys	Glu	Thr	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln
				125					130					135
Arg	Leu	Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Glu	Asn	Gln
				140					145					150
Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Trp	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Ile	Ser
				155					160					165
Ala	Val	Trp	Ser	Glu	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Trp	Cys	Lys	Ala	Glu
				170					175					180
Thr	Val	Thr	His	Arg	Ile	Arg	Lys	Gln	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Ile

185										190					195				
His	Val	Gln	Arg	Ile	Pro	Ile	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Glu	Ile	Arg					
				200					205					210					
Ala	Pro	Gly	Gly	Gln	Val	Thr	Glu	Gly	Gln	Lys	Leu	Ile	Leu	Leu					
				215					220					225					
Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Phe	Ser	Trp	Tyr					
				230					235					240					
Arg	Glu	Ala	Thr	Gly	Thr	Ser	Met	Gly	Lys	Lys	Thr	Gln	Arg	Ser					
				245					250					255					
Leu	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Ile	Pro	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Asp	Ala					
				260					265					270					
Gly	Lys	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Ala	Asp	Asn	Gly	His	Val	Pro	Ile	Gln					
				275					280					285					
Ser	Lys	Val	Val	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Pro					
				290					295					300					
Val	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln	Ala	Ala	Val	Gly	Asp					
				305					310					315					
Leu	Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile					
				320					325					330					
Leu	Tyr	Gln	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser					
				335					340					345					
Ala	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala					
				350					355					360					
Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Gly					
				365					370					375					
Ala	Gln	Cys	Ser	Glu	Ala	Val	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Pro	Asp					
				380					385					390					
Gly	Tyr	Arg	Arg	Asp	Leu	Met	Thr	Ala	Gly	Val	Leu	Trp	Gly	Leu					
				395					400					405					
Phe	Gly	Val	Leu	Gly	Phe	Thr	Gly	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ala					
				410					415					420					
Leu	Phe	His	Lys	Ile	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Thr	Asn	Glu	Pro					
				425					430					435					
Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Asn	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Tyr	Ser	Ser					
				440					445					450					
Pro	Thr	Pro	Asp	Met	Glu	Glu	Leu	Gln	Pro	Val	Tyr	Val	Asn	Val					
				455					460					465					
Gly	Ser	Val	Asp	Val	Asp	Val	Val	Tyr	Ser	Gln	Val	Trp	Ser	Met					
				470					475					480					
Gln	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Ala	Asn	Ile	Arg	Thr	Leu	Leu	Glu	Asn					
				485					490					495					

EP2489364B1

Lys Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser
500 505

<210> 17

<211> 1255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	1	5	10	15
Leu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	20	25	30	
Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	35	40	45	
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	50	55	60	
Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	65	70	75	
Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	80	85	90	
Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	95	100	105	
Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	110	115	120	
Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	125	130	135	
Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	140	145	150	
Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	155	160	165	
Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	170	175	180	
Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	185	190	195	
Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	200	205	210	
Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	215	220	225	
Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	230	235	240	
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	245	250	255	

Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala
 260 265 270
 Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
 275 280 285
 Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro
 290 295 300
 Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys
 305 310 315
 Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg
 320 325 330
 Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu
 335 340 345
 Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn
 350 355 360
 Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala
 365 370 375
 Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 380 385 390
 Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu
 395 400 405
 Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro
 410 415 420
 Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile
 425 430 435
 Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile
 440 445 450
 Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu
 455 460 465
 Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His
 485 490 495
 Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
 500 505 510
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
 515 520 525
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
 530 535 540
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 545 550 555
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln

	560		565		570
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro	Glu Ala Asp Gln Cys Val				
575	580				585
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro	Phe Cys Val Ala Arg Cys				
590	595				600
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser	Tyr Met Pro Ile Trp Lys				
605	610				615
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	Pro Cys Pro Ile Asn Cys				
620	625				630
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp	Lys Gly Cys Pro Ala Glu				
635	640				645
Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile	Ile Ser Ala Val Val Gly				
650	655				660
Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val	Val Phe Gly Ile Leu Ile				
665	670				675
Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys	Tyr Thr Met Arg Arg Leu				
680	685				690
Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro	Leu Thr Pro Ser Gly Ala				
695	700				705
Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile	Leu Lys Glu Thr Glu Leu				
710	715				720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly	Ala Phe Gly Thr Val Tyr				
725	730				735
Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu	Asn Val Lys Ile Pro Val				
740	745				750
Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr	Ser Pro Lys Ala Asn Lys				
755	760				765
Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met	Ala Gly Val Gly Ser Pro				
770	775				780
Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys	Leu Thr Ser Thr Val Gln				
785	790				795
Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly	Cys Leu Leu Asp His Val				
800	805				810
Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser	Gln Asp Leu Leu Asn Trp				
815	820				825
Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser	Tyr Leu Glu Asp Val Arg				
830	835				840
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg	Asn Val Leu Val Lys Ser				
845	850				855
Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe	Gly Leu Ala Arg Leu Leu				
860	865				870

Asp	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	His	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Val	Pro		875	880	885
Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Phe	Thr		890	895	900
His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu		905	910	915
Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Glu		920	925	930
Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro		935	940	945
Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met		950	955	960
Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu		965	970	975
Phe	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln		980	985	990
Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr		995	1000	1005
Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala		1010	1015	1020
Glu	Glu	Tyr	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro		1025	1030	1035
Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser		1040	1045	1050
Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro		1055	1060	1065
Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly		1070	1075	1080
Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala		1085	1090	1095
Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln		1100	1105	1110
Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp		1115	1120	1125
Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val		1130	1135	1140
Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly		1145	1150	1155
Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Pro		1160	1165	1170

Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe
				1175					1180					1185
Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln
				1190					1195					1200
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro
				1205					1210					1215
Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg
				1220					1225					1230
Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn
				1235					1240					1245
Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val					
				1250					1255					

<210> 18

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	Cys	Arg	Leu	His	Val	Pro	Trp	1	5	10	15
Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Asn	Pro	20	25	30	
Pro	Thr	Thr	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Asn	Val	35	40	45	
Ala	Glu	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Asn	Leu	Pro	Gln	50	55	60	
Asn	Arg	Ile	Gly	Tyr	Ser	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Gly	65	70	75	
Asn	Ser	Leu	Ile	Val	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	80	85	90	
Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	95	100	105	
Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	110	115	120	
Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	125	130	135	
Gly	Gln	Phe	His	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	140	145	150	
Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	155	160	165	
Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Val	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	170	175	180	
Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn				

				185					190					195
Gly	Asn	Met	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Lys	Arg	Asn	Asp	Ala
				200					205					210
Gly	Ser	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	Arg
				215					220					225
Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Val	Pro
				230					235					240
Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn	Tyr	Arg	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu
				245					250					255
Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser
				260					265					270
Trp	Phe	Ile	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe
				275					280					285
Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln
				290					295					300
Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Met
				305					310					315
Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Ala	Thr
				320					325					330
Val	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	Val	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Ile	
				335					340					

<210> 19

<211> 411

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met	Trp	Ser	Gly	Trp	Trp	Leu	Trp	Pro	Leu	Val	Ala	Val	Cys	Thr
1				5					10					15
Ala	Asp	Phe	Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Met	Arg	Asp	Ser
				20					25					30
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Asp
				35					40					45
Met	Phe	Asn	Asn	Arg	Leu	Gln	Asp	Glu	Arg	Ala	Asn	Leu	Thr	Thr
				50					55					60
Leu	Ala	Gly	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	Phe
				65					70					75
Val	Gly	Gly	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Cys	Asp	Thr	Gln
				80					85					90
Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Glu	Gln	Met	Asp	Val	Val
				95					100					105
His	Arg	Met	Cys	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Thr
				110					115					120

Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Gln	Ala	Phe	Arg	Glu	Gly	Lys	Val	Ala		125	130	135
Ser	Leu	Ile	Gly	Val	Glu	Gly	Gly	His	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Leu		140	145	150
Gly	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gly	Met	Arg	Tyr	Leu	Thr		155	160	165
Leu	Thr	His	Ser	Cys	Asn	Thr	Pro	Trp	Ala	Asp	Asn	Trp	Leu	Val		170	175	180
Asp	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Pro	Gln	Ser	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Phe		185	190	195
Gly	Gln	Arg	Val	Val	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Leu	Gly	Val	Leu	Ile		200	205	210
Asp	Leu	Ala	His	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Met	Lys	Ala	Thr	Leu	Gln		215	220	225
Leu	Ser	Arg	Ala	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	His	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser		230	235	240
Val	Cys	Ala	Ser	Arg	Arg	Asn	Val	Pro	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu		245	250	255
Val	Lys	Gln	Thr	Asp	Ser	Leu	Val	Met	Val	Asn	Phe	Tyr	Asn	Asn		260	265	270
Tyr	Ile	Ser	Cys	Thr	Asn	Lys	Ala	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Asp		275	280	285
His	Leu	Asp	His	Ile	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Val	Gly		290	295	300
Phe	Gly	Gly	Asp	Phe	Asp	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Glu	Gly	Leu		305	310	315
Glu	Asp	Val	Ser	Lys	Tyr	Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg		320	325	330
Arg	Asn	Trp	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Lys	Gly	Ala	Leu	Ala	Asp	Asn		335	340	345
Leu	Leu	Arg	Val	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Ser	Asn	Leu	Thr		350	355	360
Gln	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ile	Pro	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Gly		365	370	375
Ser	Cys	Arg	Thr	His	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu		380	385	390
His	Arg	His	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Pro	Leu	Val		395	400	405
Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Leu											410		

EP2489364B1

<210> 20

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met	Arg	Ala	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	1	5	10	15
Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	Trp	Gly	Arg	Ala	Val	20	25	30	
Pro	Cys	Val	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Phe	35	40	45	
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu	50	55	60	
Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	65	70	75	
Tyr	Gly	Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile	80	85	90	
Asn	Arg	Thr	Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	95	100	105	
His	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Gly	Thr	Lys	Cys	110	115	120	
Ser	Lys	Trp	Ala	Glu	Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	125	130	135	
Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser	140	145	150	
Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	155	160	165	
Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys	170	175	180	
Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	185	190	195	
Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	200	205	210	
Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Pro	215	220	225	
Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	Arg	Thr	Leu	230	235	240	
Lys	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Phe	Trp	Tyr	245	250	255	
Val	Leu	Pro	Ile	Ser	Ile	Thr	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Val	Met	Gly	260	265	270	
Tyr	Ser	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro				

275										280					285				
Ala	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Glu	Phe	Asp	Lys	Arg	Phe					
				290					295					300					
Phe	Val	Pro	Ala	Glu	Lys	Ile	Val	Ile	Asn	Phe	Ile	Thr	Leu	Asn					
				305					310					315					
Ile	Ser	Asp	Asp	Ser	Lys	Ile	Ser	His	Gln	Asp	Met	Ser	Leu	Leu					
				320					325					330					
Gly	Lys	Ser	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Pro	Ser					
				335					340					345					
Gly	Asn	Leu	Arg	Pro	Pro	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	His	Leu					
				350					355					360					
Gly	Tyr	Ala	Ser	His	Leu	Met	Glu	Ile	Phe	Cys	Asp	Ser	Glu	Glu					
				365					370					375					
Asn	Thr	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Gln	Gln	Glu	Ser	Leu	Ser	Arg					
				380					385					390					
Thr	Ile	Pro	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Ile	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Val					
				395					400					405					
Arg	Thr	Thr	Asp	Ile	Cys	Ala	Gly	Pro	Glu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser					
				410					415					420					
Leu	Gln	Glu	Glu	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Glu	Ser	Gln					
				425					430					435					
Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr					
				440					445					450					
Thr	Pro	Gln	Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Gln	Glu	His	Thr					
				455					460					465					
Asp	Ser	Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu	Val					
				470					475					480					
Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Thr	Gly	Arg	Leu	Cys	Ile	Pro	Ser	Leu	Ser					
				485					490					495					
Ser	Phe	Asp	Gln	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Asp					
				500					505					510					
Gly	Leu	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Glu	Pro					
				515					520					525					
Ala	Pro	Asp	Arg	Pro	Pro	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Gln					
				530					535					540					
Phe	Met	Glu	Glu	Trp	Gly	Leu	Tyr	Val	Gln	Met	Glu	Asn							
				545					550										

EP2489364B1

<210> 21

<211> 911

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met	Ala	Gln	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Leu	Ala		1	5	10	15
Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser		20	25	30	
Glu	Asp	Arg	Ala	Phe	Arg	Val	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu		35	40	45	
Gln	Gly	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Ile	Pro	Cys	His	Val	His		50	55	60	
Tyr	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Pro		65	70	75	
Arg	Val	Lys	Trp	Thr	Phe	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Ala	Glu	Val		80	85	90	
Leu	Val	Ala	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Lys	Val	Asn	Glu	Ala	Tyr	Arg		95	100	105	
Phe	Arg	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Val		110	115	120	
Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Arg	Pro	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr		125	130	135	
Arg	Cys	Glu	Val	Gln	His	Gly	Ile	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Ala	Val		140	145	150	
Glu	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ser		155	160	165	
Ala	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Ala	Gln	Glu	Ala	Cys	Ala		170	175	180	
Arg	Ile	Gly	Ala	His	Ile	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	Leu	Tyr	Ala	Ala		185	190	195	
Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gln	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp	Leu	Ser	Asp		200	205	210	
Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Glu	Ala	Cys	Tyr		215	220	225	
Gly	Asp	Met	Asp	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Arg	Asn	Tyr	Gly	Val	Val		230	235	240	
Asp	Pro	Asp	Asp	Leu	Tyr	Asp	Val	Tyr	Cys	Tyr	Ala	Glu	Asp	Leu		245	250	255	
Asn	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu		260	265	270	
Glu	Glu	Ala	Arg	Ala	Tyr	Cys	Gln	Glu	Arg	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala		275	280	285	
Thr	Thr	Gly	Gln	Leu	Tyr	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	His		290	295	300	

Cys	Ser	Pro	Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	305	310	315
Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Cys	Gly	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	320	325	330
Thr	Leu	Phe	Leu	Phe	Pro	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe	Pro	Asn	Lys	His	335	340	345
Ser	Arg	Phe	Asn	Val	Tyr	Cys	Phe	Arg	Asp	Ser	Ala	Gln	Pro	Ser	350	355	360
Ala	Ile	Pro	Glu	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	365	370	375
Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Val	Thr	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	380	385	390
Gln	Leu	Pro	Gln	Glu	Ala	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Arg	Gly	Ala	Ile	395	400	405
Tyr	Ser	Ile	Pro	Ile	Met	Glu	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	410	415	420
Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	Glu	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	425	430	435
Thr	Gln	Ser	Met	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Phe	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	440	445	450
Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Lys	455	460	465
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	Leu	Trp	470	475	480
Ala	Trp	Pro	Ser	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Leu	485	490	495
Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Ala	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Pro	500	505	510
Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	515	520	525
Glu	Ser	Glu	Ala	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Val	His	Gly	Pro	Pro	Thr	530	535	540
Glu	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Arg	Glu	Arg	Asn	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	545	550	555
Pro	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Thr	Gly	560	565	570
Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Gly	Val	Pro	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Glu	Thr	575	580	585
Gly	Ser	Ser	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Thr	Arg	Ala	590	595	600
Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Ser			

605					610					615				
Gly	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	Ala	Gln	Pro	Val
				620					625					630
Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Val	Pro
				635					640					645
Ala	Ser	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Ser	Pro	Cys	His	Asn	Gly	Gly	Thr
				650					655					660
Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Cys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gly
				665					670					675
Tyr	Gly	Gly	Asp	Leu	Cys	Asp	Val	Gly	Leu	Arg	Phe	Cys	Asn	Pro
				680					685					690
Gly	Trp	Asp	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Cys	Tyr	Lys	His	Phe	Ser	Thr
				695					700					705
Arg	Arg	Ser	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Thr	Gln	Cys	Arg	Met	Tyr	Gly
				710					715					720
Ala	His	Leu	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile
				725					730					735
Asn	Asn	Arg	Tyr	Arg	Glu	Tyr	Gln	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Asp	Arg
				740					745					750
Thr	Ile	Glu	Gly	Asp	Phe	Leu	Trp	Ser	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	Leu
				755					760					765
Tyr	Glu	Asn	Trp	Asn	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Ser	Tyr	Phe	Leu	Ser
				770					775					780
Gly	Glu	Asn	Cys	Val	Val	Met	Val	Trp	His	Asp	Gln	Gly	Gln	Trp
				785					790					795
Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asn	Tyr	His	Leu	Ser	Tyr	Thr	Cys	Lys	Met
				800					805					810
Gly	Leu	Val	Ser	Cys	Gly	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Gln
				815					820					825
Val	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Asp	Thr	Val	Leu
				830					835					840
Arg	Tyr	Arg	Cys	Arg	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu
				845					850					855
Ile	Arg	Cys	Gln	Glu	Asn	Gly	Arg	Trp	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Ser
				860					865					870
Cys	Val	Pro	Arg	Arg	Pro	Ala	Arg	Ala	Leu	His	Pro	Glu	Glu	Asp
				875					880					885
Pro	Glu	Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg	Trp	Lys	Ala	Leu
				890					895					900
Leu	Ile	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Pro	Gly	Pro				
				905					910					

EP2489364B1

<210> 22

<211> 987

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met	Ala	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	1	5	10	15
Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Met	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	20	25	30	
Ala	Glu	Leu	Gly	Trp	Met	Val	His	Pro	Pro	Ser	Gly	Trp	Glu	Glu	35	40	45	
Val	Ser	Gly	Tyr	Asp	Glu	Asn	Met	Asn	Thr	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln	50	55	60	
Val	Cys	Asn	Val	Phe	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr	65	70	75	
Lys	Phe	Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	His	Arg	Ile	His	Val	Glu	Met	80	85	90	
Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Gly	95	100	105	
Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Asp	Phe	110	115	120	
Asp	Ser	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	Trp	Met	Glu	Asn	Pro	Trp	125	130	135	
Val	Lys	Val	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Gln	Val	140	145	150	
Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Met	Lys	Ile	Asn	Thr	Glu	Val	Arg	Ser	155	160	165	
Phe	Gly	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	170	175	180	
Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Ser	Leu	Ile	Ala	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Arg	185	190	195	
Lys	Cys	Pro	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Phe	Gln	Glu	Thr	200	205	210	
Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Ser	215	220	225	
Cys	Ile	Ala	Asn	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Ile	Lys	Leu	Tyr	230	235	240	
Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Arg	Cys	Met	245	250	255	
Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Val	Cys	Arg	260	265	270	

Gly Cys Pro Ser	Gly Thr Phe Lys Ala	Asn Gln Gly Asp Glu Ala	275	280	285
Cys Thr His Cys	Pro Ile Asn Ser Arg	Thr Thr Ser Glu Gly Ala	290	295	300
Thr Asn Cys Val	Cys Arg Asn Gly Tyr	Tyr Arg Ala Asp Leu Asp	305	310	315
Pro Leu Asp Met	Pro Cys Thr Thr Ile	Pro Ser Ala Pro Gln Ala	320	325	330
Val Ile Ser Ser	Val Asn Glu Thr Ser	Leu Met Leu Glu Trp Thr	335	340	345
Pro Pro Arg Asp	Ser Gly Gly Arg Glu	Asp Leu Val Tyr Asn Ile	350	355	360
Ile Cys Lys Ser	Cys Gly Ser Gly Arg	Gly Ala Cys Thr Arg Cys	365	370	375
Gly Asp Asn Val	Gln Tyr Ala Pro Arg	Gln Leu Gly Leu Thr Glu	380	385	390
Pro Arg Ile Tyr	Ile Ser Asp Leu Leu	Ala His Thr Gln Tyr Thr	395	400	405
Phe Glu Ile Gln	Ala Val Asn Gly Val	Thr Asp Gln Ser Pro Phe	410	415	420
Ser Pro Gln Phe	Ala Ser Val Asn Ile	Thr Thr Asn Gln Ala Ala	425	430	435
Pro Ser Ala Val	Ser Ile Met His Gln	Val Ser Arg Thr Val Asp	440	445	450
Ser Ile Thr Leu	Ser Trp Ser Gln Pro	Asp Gln Pro Asn Gly Val	455	460	465
Ile Leu Asp Tyr	Glu Leu Gln Tyr Tyr	Glu Lys Glu Leu Ser Glu	470	475	480
Tyr Asn Ala Thr	Ala Ile Lys Ser Pro	Thr Asn Thr Val Thr Val	485	490	495
Gln Gly Leu Lys	Ala Gly Ala Ile Tyr	Val Phe Gln Val Arg Ala	500	505	510
Arg Thr Val Ala	Gly Tyr Gly Arg Tyr	Ser Gly Lys Met Tyr Phe	515	520	525
Gln Thr Met Thr	Glu Ala Glu Tyr Gln	Thr Ser Ile Gln Glu Lys	530	535	540
Leu Pro Leu Ile	Ile Gly Ser Ser Ala	Ala Gly Leu Val Phe Leu	545	550	555
Ile Ala Val Val	Val Ile Ala Ile Val	Cys Asn Arg Arg Arg Gly	560	565	570
Phe Glu Arg Ala	Asp Ser Glu Tyr Thr	Asp Lys Leu Gln His Tyr			

575					580					585				
Thr	Ser	Gly	His	Met	Thr	Pro	Gly	Met	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asp	Pro
				590					595					600
Phe	Thr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Lys
				605					610					615
Glu	Ile	Asp	Ile	Ser	Cys	Val	Lys	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Ala
				620					625					630
Gly	Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Leu	Pro	Gly
				635					640					645
Lys	Arg	Glu	Ile	Phe	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr
				650					655					660
Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met
				665					670					675
Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	Val
				680					685					690
Thr	Lys	Ser	Thr	Pro	Val	Met	Ile	Ile	Thr	Glu	Phe	Met	Glu	Asn
				695					700					705
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Arg	Gln	Asn	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr
				710					715					720
Val	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Met
				725					730					735
Lys	Tyr	Leu	Ala	Asp	Met	Asn	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
				740					745					750
Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp
				755					760					765
Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr
				770					775					780
Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala
				785					790					795
Pro	Glu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val
				800					805					810
Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu
				815					820					825
Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ile
				830					835					840
Glu	Gln	Asp	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	Cys	Pro	Ser	Ala
				845					850					855
Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Gln	Lys	Asp	Arg	Asn	His
				860					865					870
Arg	Pro	Lys	Phe	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Leu	Asp	Lys	Met	Ile
				875					880					885

Arg	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Met	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Gly	890	895	900
Ile	Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Tyr	Thr	Ser	905	910	915
Phe	Asn	Thr	Val	Asp	Glu	Trp	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Gln	920	925	930
Tyr	Lys	Glu	Ser	Phe	Ala	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	Asp	Val	935	940	945
Val	Ser	Gln	Met	Met	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr	950	955	960
Leu	Ala	Gly	His	Gln	Lys	Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Gln	Val	Met	965	970	975
Arg	Ala	Gln	Met	Asn	Gln	Ile	Gln	Ser	Val	Glu	Val				980	985	

<210> 23

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	1	5	10	15
Ile	Ile	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	20	25	30	
Ile	Ser	Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	35	40	45	
Gly	Asn	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	Pro	50	55	60	
Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	Glu	Gly	65	70	75	
Val	Leu	Gly	Leu	Val	His	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Lys	Asp	Glu	Leu	80	85	90	
Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Phe	Ala	95	100	105	
Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Asn	Val	110	115	120	
Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Lys	Cys	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	125	130	135	
Lys	Gly	Lys	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	140	145	150	
Ser	Met	Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	155	160	165	
Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Val	Val	170	175	180	
Trp	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Gln	Gly	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Val	Ser	185	190	195	
Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Met	Lys	Val	200	205	210	
Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Cys	215	220	225	
Met	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile	Ala	Lys	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	230	235	240	
Thr	Glu	Ser	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Leu	Gln	Leu	Leu	Asn	245	250	255	
Ser	Lys	Ala	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Ser	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Trp	260	265	270	
Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Met	Leu	Lys	275	280					

EP2489364B1

<210> 24

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Met	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15
Gln	Pro	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Ser	Cys	Lys	Ala	Gln	Val
				20					25					30
Ser	Asn	Glu	Asp	Cys	Leu	Gln	Val	Glu	Asn	Cys	Thr	Gln	Leu	Gly
				35					40					45
Glu	Gln	Cys	Trp	Thr	Ala	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Thr
				50					55					60
Val	Ile	Ser	Lys	Gly	Cys	Ser	Leu	Asn	Cys	Val	Asp	Asp	Ser	Gln
				65					70					75
Asp	Tyr	Tyr	Val	Gly	Lys	Lys	Asn	Ile	Thr	Cys	Cys	Asp	Thr	Asp
				80					85					90
Leu	Cys	Asn	Ala	Ser	Gly	Ala	His	Ala	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Ala
				95					100					105
Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro
				110					115					120
Gly	Gln	Leu												

<210> 25

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	1	5	10	15
Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Tyr	His	Thr	Asn	Tyr	Val		20	25	30	
Arg	Asn	Ser	Arg	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Trp	Ala	Ile	Phe	Thr	Ile		35	40	45	
Cys	Phe	Ala	Ile	Val	Asn	Val	Val	Cys	Phe	Ile	Gln	Pro	Tyr	Trp		50	55	60	
Ile	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Tyr	Phe	Gly	Leu		65	70	75	
Phe	His	Tyr	Cys	Ile	Gly	Asn	Gly	Phe	Ser	Arg	Glu	Leu	Thr	Cys		80	85	90	
Arg	Gly	Ser	Phe	Thr	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Phe		95	100	105	
Lys	Ala	Ala	Ser	Phe	Phe	Ile	Gly	Leu	Ser	Met	Met	Leu	Ile	Ile		110	115	120	
Ala	Cys	Ile	Ile	Cys	Phe	Thr	Leu	Phe	Phe	Phe	Cys	Asn	Thr	Ala		125	130	135	
Thr	Val	Tyr	Lys	Ile	Cys	Ala	Trp	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Ala	Ala		140	145	150	
Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Cys	Met	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser		155	160	165	
Asp	Glu	Val	Lys	Arg	Met	Cys	Gly	Glu	Lys	Thr	Asp	Lys	Tyr	Thr		170	175	180	
Leu	Gly	Ala	Cys	Ser	Val	Arg	Trp	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile		185	190	195	
Gly	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Ala	Phe	Val	Leu		200	205	210	
Gly	Asn	Arg	Gln	Asp	Ser	Leu	Met	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu		215	220	225	
Asn	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Ser	Leu	Glu						230	235		

<210> 26

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

EP2489364B1

<400> 26

Met	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Pro	Ala	
1				5					10					15	
Pro	Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	
				20					25					30	
His	Cys	Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro	
				35					40					45	
Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln	
				50					55					60	
Glu	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	
				65					70					75	
Gly	Leu	Leu	Phe	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	
				80					85					90	
Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Arg	Arg	Gln	
				95					100					105	
Arg	Arg	Leu	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Ala	Glu	Ala	Pro	Asp	Gly	Asp	
				110					115					120	
Lys	Asp	Ala	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp	Lys	Val	Ile	Ile	Leu	Ser	Pro	
				125					130					135	
Gly	Ile	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Trp	Pro	Pro	Pro	Gly	Glu	
				140					145					150	
Asp	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Pro	Gly	His	Ser	Val	Pro	Val	Pro	Ala	
				155					160					165	
Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Thr	Thr	Lys	Thr	Ala	Gly	
				170					175					180	
Pro	Glu	Gln	Gln												

<210> 27

<211> 847

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Tyr	1	5	10	15
Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu	20	25	30	
Thr	Leu	Tyr	Ala	Trp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ile	Pro	Cys	Thr	35	40	45	
Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Leu	Phe	His	50	55	60	
Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg	65	70	75	
Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Lys	80	85	90	
Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	95	100	105	

Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	110	115	120
Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn	125	130	135
Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	140	145	150
Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe	155	160	165
Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	170	175	180
Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	185	190	195
Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	200	205	210
Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp	215	220	225
Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	230	235	240
Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val	245	250	255
Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	260	265	270
Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	275	280	285
Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	290	295	300
Lys	Asp	Gln	Ser	Gly	Lys	Tyr	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val	305	310	315
Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Glu	Glu	Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	320	325	330
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val	Gln	Ile	Leu	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	335	340	345
Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	350	355	360
Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly	365	370	375
Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro	Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His	380	385	390
Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	395	400	405
Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Lys			

410										415					420				
Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly					
				425					430					435					
Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser					
				440					445					450					
Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro					
				455					460					465					
Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr					
				470					475					480					
Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Arg	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser					
				485					490					495					
Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val					
				500					505					510					
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val					
				515					520					525					
Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln					
				530					535					540					
Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln					
				545					550					555					
Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser					
				560					565					570					
Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp					
				575					580					585					
Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met					
				590					595					600					
Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr					
				605					610					615					
Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe					
				620					625					630					
Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	His	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg					
				635					640					645					
Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln					
				650					655					660					
Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu					
				665					670					675					
Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val					
				680					685					690					
Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Gly					
				695					700					705					
Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly					
				710					715					720					

Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	
				725					730					735	
Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	
				740					745					750	
Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	
				755					760					765	
Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Ser	
				770					775					780	
Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Thr	Cys	Asp	Asp	Thr	Val	Thr	
				785					790					795	
Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	
				800					805					810	
Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Leu	
				815					820					825	
Ile	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	Glu	Asn	Val	
				830					835					840	
Asp	Tyr	Val	Ile	Leu	Lys	His									
				845											

<210> 28

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Ile	1	5	10	15
Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	20	25	30	
Gln	Ala	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	35	40	45	
Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	50	55	60	
Asn	Ala	Asn	Val	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	65	70	75	
Trp	Pro	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	80	85	90	
Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Ser	His	Gly	Gly	Ile	Tyr	Val	95	100	105	
Cys	Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Asn	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Ser	Cys	Gly	110	115	120	
Thr	Tyr	Leu	Arg	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	125	130	135	
Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	140	145	150	
Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	155	160	165	
Arg	Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	170	175	180	
Glu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	185	190	195	
Cys	Ser	Met	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Tyr	200	205	210	
Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	215	220	225	

Pro

<210> 29

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met	Asn	Tyr	Pro	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Asp	Leu	Glu	Asn	Leu	Glu	1	5	10	15
Asp	Leu	Phe	Trp	Glu	Leu	Asp	Arg	Leu	Asp	Asn	Tyr	Asn	Asp	Thr	20	25	30	
Ser	Leu	Val	Glu	Asn	His	Leu	Cys	Pro	Ala	Thr	Glu	Gly	Pro	Leu	35	40	45	
Met	Ala	Ser	Phe	Lys	Ala	Val	Phe	Val	Pro	Val	Ala	Tyr	Ser	Leu	50	55	60	
Ile	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Ile	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Leu	Val	Ile	65	70	75	
Leu	Glu	Arg	His	Arg	Gln	Thr	Arg	Ser	Ser	Thr	Glu	Thr	Phe	Leu	80	85	90	
Phe	His	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Leu	Pro	95	100	105	
Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Gly	Ser	Val	Gly	Trp	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	110	115	120	
Leu	Cys	Lys	Thr	Val	Ile	Ala	Leu	His	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Cys	125	130	135	
Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Cys	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	140	145	150	
Ile	Val	His	Ala	Val	His	Ala	Tyr	Arg	His	Arg	Arg	Leu	Leu	Ser	155	160	165	
Ile	His	Ile	Thr	Cys	Gly	Thr	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Phe	Leu	Leu				

170										175					180				
Ala	Leu	Pro	Glu	Ile	Leu	Phe	Ala	Lys	Val	Ser	Gln	Gly	His	His					
				185					190					195					
Asn	Asn	Ser	Leu	Pro	Arg	Cys	Thr	Phe	Ser	Gln	Glu	Asn	Gln	Ala					
				200					205					210					
Glu	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Tyr	His	Val	Ala					
				215					220					225					
Gly	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Leu	Val	Met	Gly	Trp	Cys	Tyr	Val	Gly					
				230					235					240					
Val	Val	His	Arg	Leu	Arg	Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Pro	Gln	Arg	Gln					
				245					250					255					
Lys	Ala	Val	Arg	Val	Ala	Ile	Leu	Val	Thr	Ser	Ile	Phe	Phe	Leu					
				260					265					270					
Cys	Trp	Ser	Pro	Tyr	His	Ile	Val	Ile	Phe	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala					
				275					280					285					
Arg	Leu	Lys	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Cys	Lys	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu					
				290					295					300					
Pro	Val	Ala	Ile	Thr	Met	Cys	Glu	Phe	Leu	Gly	Leu	Ala	His	Cys					
				305					310					315					
Cys	Leu	Asn	Pro	Met	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ala	Gly	Val	Lys	Phe	Arg					
				320					325					330					
Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro					
				335					340					345					
Ala	Ser	Leu	Cys	Gln	Leu	Phe	Pro	Ser	Trp	Arg	Arg	Ser	Ser	Leu					
				350					355					360					
Ser	Glu	Ser	Glu	Asn	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Thr	Phe								
				365					370										

<210> 30

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met	Gly	Ser	Gly	Trp	Val	Pro	Trp	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	
1				5					10					15	
Leu	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Met	Thr	Gln	Gly	Thr	Asp	Ser	Pro	
				20					25					30	
Glu	Asp	Phe	Val	Ile	Gln	Ala	Lys	Ala	Asp	Cys	Tyr	Phe	Thr	Asn	
				35					40					45	
Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Gln	Phe	Val	Val	Arg	Phe	Ile	Phe	Asn	Leu	
				50					55					60	
Glu	Glu	Tyr	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Met	Phe	Val	Ala	
				65					70					75	
Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Gln	Pro	Asp	Ala	Glu	Gln	Trp	Asn	Ser	Arg	
				80					85					90	
Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	Arg	Gln	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Cys	
				95					100					105	
Arg	His	Asn	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Phe	Thr	Val	Gly	Arg	Lys	
				110					115					120	
Val	Gln	Pro	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	
				125					130					135	
His	Gln	His	Asn	Leu	Leu	His	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	
				140					145					150	
Gly	Asp	Ile	Lys	Ile	Lys	Trp	Phe	Leu	Asn	Gly	Gln	Glu	Glu	Arg	
				155					160					165	
Ala	Gly	Val	Met	Ser	Thr	Gly	Pro	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp	Thr	
				170					175					180	
Phe	Gln	Thr	Val	Val	Met	Leu	Glu	Met	Thr	Pro	Glu	Leu	Gly	His	
				185					190					195	
Val	Tyr	Thr	Cys	Leu	Val	Asp	His	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Val	
				200					205					210	
Ser	Val	Glu	Trp	Arg	Ala	Gln	Ser	Glu	Tyr	Ser	Trp	Arg	Lys	Met	
				215					220					225	
Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	
				230					235					240	
Val	Gly	Ile	Val	Ile	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg	
				245					250					255	
Thr	Gln	Met	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	
				260					265					270	
Gln	Ser	Cys													

EP2489364B1

<210> 31

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met	Gly	Gln	Ala	Gly	Cys	Lys	Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Phe	Asp
1				5					10					15
Tyr	Lys	Thr	Glu	Lys	Tyr	Val	Ile	Ala	Lys	Asn	Lys	Lys	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Ile	Leu	Ala	Tyr	Leu	Val
				35					40					45
Val	Trp	Val	Phe	Leu	Ile	Lys	Lys	Gly	Tyr	Gln	Asp	Val	Asp	Thr
				50					55					60

Ser	Leu	Gln	Ser	Ala	Val	Ile	Thr	Lys	Val	Lys	Gly	Val	Ala	Phe	
				65					70					75	
Thr	Asn	Thr	Ser	Asp	Leu	Gly	Gln	Arg	Ile	Trp	Asp	Val	Ala	Asp	
				80					85					90	
Tyr	Val	Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Phe	Val	Val	Thr	
				95					100					105	
Asn	Leu	Ile	Val	Thr	Pro	Asn	Gln	Arg	Gln	Asn	Val	Cys	Ala	Glu	
				110					115					120	
Asn	Glu	Gly	Ile	Pro	Asp	Gly	Ala	Cys	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Cys	
				125					130					135	
His	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Gly	
				140					145					150	
Arg	Cys	Leu	Arg	Arg	Glu	Asn	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	Cys	Glu	Ile	
				155					160					165	
Phe	Ala	Trp	Cys	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Arg	Pro	Glu	Glu	Pro	
				170					175					180	
Phe	Leu	Lys	Glu	Ala	Glu	Asp	Phe	Thr	Ile	Phe	Ile	Lys	Asn	His	
				185					190					195	
Ile	Arg	Phe	Pro	Lys	Phe	Asn	Phe	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Met	Asp	
				200					205					210	
Val	Lys	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Ser	Cys	His	Phe	Gly	Pro	Lys	
				215					220					225	
Asn	His	Tyr	Cys	Pro	Ile	Phe	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Ile	Arg	Trp	
				230					235					240	
Ala	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Ile	
				245					250					255	
Gly	Ile	Asn	Ile	Glu	Trp	Asn	Cys	Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Ala	Ser	
				260					265					270	
Glu	Cys	His	Pro	His	Tyr	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu	Asp	Asn	Lys	Leu	
				275					280					285	
Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Arg	Phe	Ala	Arg	Tyr	
				290					295					300	
Tyr	Arg	Asp	Ala	Ala	Gly	Val	Glu	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Lys	Ala	
				305					310					315	
Tyr	Gly	Ile	Arg	Phe	Asp	Val	Met	Val	Asn	Gly	Lys	Gly	Ala	Phe	
				320					325					330	
Phe	Cys	Asp	Leu	Val	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Lys	Lys	Arg	Glu	Phe	
				335					340					345	
Tyr	Arg	Asp	Lys	Lys	Tyr	Glu	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	
				350					355					360	
Ser	Gln	Glu	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Glu	

EP2489364B1

	365		370		375									
Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Pro	Glu	Gln	Gln
				380					385					390
Glu	Leu	Gln	Glu	Pro	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln
				395					400					405
Lys	Gly	Asn	Gly	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Leu	Leu	Glu	Pro	His	Arg
				410					415					420
Ser	Thr													

<210> 32

<211> 359

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Arg	Phe	Val	Lys	Ala	1	5	10	15
Pro	Leu	Lys	Lys	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Leu	Gly	Gln	Asp	Pro	Gly	20	25	30	
Ala	Asp	Asp	Asp	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asn	Val	Gln	Val	Pro	35	40	45	
Ala	Val	Leu	Gly	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	50	55	60	
Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Lys	Ser	Glu	Gln	Pro	Thr	Ala	Ser	Trp	Arg	65	70	75	
Ala	Val	Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Gly	Arg	Ile	Leu	Pro	Cys	Arg	Thr	80	85	90	
Thr	Cys	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Leu	95	100	105	
Leu	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Ile	Cys	Leu	Gly	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	110	115	120	
Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Val	Thr	125	130	135	
Asn	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Lys	Ile	Thr	Gln	Leu	140	145	150	
Gly	Gln	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Glu	Leu	Ala	155	160	165	
Gln	Ser	Gln	Glu	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Arg	Ala	His	Gln	Ala	170	175	180	
Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys	Gln	Ala	Asp	Arg	Gln	Lys	Thr	185	190	195	
Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu	200	205	210	

Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Met	Glu	Asn	Arg	Leu	Lys	Pro	Phe	Phe	Thr	215	220	225
Cys	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Cys	Pro	Ser	Gly	Trp	Ile	Met	His	230	235	240
Gln	Lys	Ser	Cys	Phe	Tyr	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	Asn	Trp	Gln	245	250	255
Glu	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr	260	265	270
Phe	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gln	Ser	His	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Asn	275	280	285
Ser	Leu	Leu	Pro	Asn	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	290	295	300
Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Thr	Gln	Arg	305	310	315
Thr	Arg	Thr	Tyr	Ala	Gln	Ser	Ser	Lys	Cys	Asn	Lys	Val	His	Lys	320	325	330
Thr	Trp	Ser	Trp	Trp	Thr	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	335	340	345
Leu	Pro	Tyr	Ile	Cys	Glu	Met	Thr	Ala	Phe	Arg	Phe	Pro	Asp		350	355	

<210> 33

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met	Ala	Phe	Asp	Val	Ser	Cys	Phe	Phe	Trp	Val	Val	Leu	Phe	Ser	1	5	10	15
Ala	Gly	Cys	Lys	Val	Ile	Thr	Ser	Trp	Asp	Gln	Met	Cys	Ile	Glu	20	25	30	
Lys	Glu	Ala	Asn	Lys	Thr	Tyr	Asn	Cys	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Ser	35	40	45	
Glu	Ile	Pro	Asp	Thr	Leu	Pro	Asn	Thr	Thr	Glu	Phe	Leu	Glu	Phe	50	55	60	
Ser	Phe	Asn	Phe	Leu	Pro	Thr	Ile	His	Asn	Arg	Thr	Phe	Ser	Arg	65	70	75	
Leu	Met	Asn	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Leu	Thr	Arg	Cys	Gln	Ile	Asn	80	85	90	
Trp	Ile	His	Glu	Asp	Thr	Phe	Gln	Ser	His	His	Gln	Leu	Ser	Thr	95	100	105	
Leu	Val	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Phe	Met	Ala	Glu	Thr	Ser	110	115	120	

Leu	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	His	Leu	Phe	Leu	Ile	Gln	Thr		125	130	135
Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	His	Asn	Leu	Glu	Asn		140	145	150
Leu	Glu	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	His	Ile	Ser	Ser	Ile	Lys		155	160	165
Phe	Pro	Lys	Asp	Phe	Pro	Ala	Arg	Asn	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Phe		170	175	180
Gln	Asn	Asn	Ala	Ile	His	Tyr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asp	Met	Arg	Ser		185	190	195
Leu	Glu	Gln	Ala	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Asn	Phe	Asn	Gly	Asn	Asn		200	205	210
Val	Lys	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Ala	Phe	Asp	Ser	Thr	Val	Phe	Gln		215	220	225
Ser	Leu	Asn	Phe	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Phe	Asn		230	235	240
Gly	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Thr	Gln	Ser	Leu	Trp	Leu	Gly	Thr	Phe		245	250	255
Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Glu	Asp	Ile	Ser	Ser	Ala	Met	Leu	Lys	Gly		260	265	270
Leu	Cys	Glu	Met	Ser	Val	Glu	Ser	Leu	Asn	Leu	Gln	Glu	His	Arg		275	280	285
Phe	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Gln	Cys	Phe	Thr	Gln	Leu		290	295	300
Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser		305	310	315
Gly	Met	Lys	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ser	Val		320	325	330
Asn	His	Phe	Asp	Gln	Leu	Cys	Gln	Ile	Ser	Ala	Ala	Asn	Phe	Pro		335	340	345
Ser	Leu	Thr	His	Leu	Tyr	Ile	Arg	Gly	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	His		350	355	360
Leu	Gly	Val	Gly	Cys	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu		365	370	375
Asp	Leu	Ser	His	Asn	Asp	Ile	Glu	Ala	Ser	Asp	Cys	Cys	Ser	Leu		380	385	390
Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Thr	Leu	Asn	Leu	Ser	His		395	400	405
Asn	Glu	Pro	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gln	Ala	Phe	Lys	Glu	Cys	Pro		410	415	420
Gln	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Phe	Thr	Arg	Leu	His	Ile	Asn				

	425		430		435
Ala Pro Gln Ser	Pro Phe Gln Asn Leu	His Phe Leu Gln Val	Leu		
	440		445		450
Asn Leu Thr Tyr	Cys Phe Leu Asp Thr	Ser Asn Gln His Leu	Leu		
	455		460		465
Ala Gly Leu Pro	Val Leu Arg His Leu	Asn Leu Lys Gly Asn	His		
	470		475		480
Phe Gln Asp Gly	Thr Ile Thr Lys Thr	Asn Leu Leu Gln Thr	Val		
	485		490		495
Gly Ser Leu Glu	Val Leu Ile Leu Ser	Ser Cys Gly Leu Leu	Ser		
	500		505		510
Ile Asp Gln Gln	Ala Phe His Ser Leu	Gly Lys Met Ser His	Val		
	515		520		525
Asp Leu Ser His	Asn Ser Leu Thr Cys	Asp Ser Ile Asp Ser	Leu		
	530		535		540
Ser His Leu Lys	Gly Ile Tyr Leu Asn	Leu Ala Ala Asn Ser	Ile		
	545		550		555
Asn Ile Ile Ser	Pro Arg Leu Leu Pro	Ile Leu Ser Gln Gln	Ser		
	560		565		570
Thr Ile Asn Leu	Ser His Asn Pro Leu	Asp Cys Thr Cys Ser	Asn		
	575		580		585
Ile His Phe Leu	Thr Trp Tyr Lys Glu	Asn Leu His Lys Leu	Glu		
	590		595		600
Gly Ser Glu Glu	Thr Thr Cys Ala Asn	Pro Pro Ser Leu Arg	Gly		
	605		610		615
Val Lys Leu Ser	Asp Val Lys Leu Ser	Cys Gly Ile Thr Ala	Ile		
	620		625		630
Gly Ile Phe Phe	Leu Ile Val Phe Leu	Leu Leu Leu Ala Ile	Leu		
	635		640		645
Leu Phe Phe Ala	Val Lys Tyr Leu Leu	Arg Trp Lys Tyr Gln	His		
	650		655		660
Ile					

<210> 34

<211> 429

<212> PRT

<213> Sarcophaga bullata

EP2489364B1

<400> 34

Met	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Cys	Ala	Pro	Leu	Cys	Glu
1				5					10					15
Pro	Ala	Glu	Leu	Phe	Leu	Ile	Ala	Ser	Pro	Ser	His	Pro	Thr	Glu
				20					25					30

Gly	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Met	Pro	Phe	Leu	Gln	Ser
				35					40					45
Ser	Asp	Ala	Gln	Phe	Gln	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Asp	Thr	Arg	Ala
				50					55					60
Leu	Gly	Pro	Gly	Trp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Gln	Ile	Ala	Ala
				65					70					75
Met	Trp	Lys	Glu	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Trp	Cys	Glu	Ala	Gln	Thr
				80					85					90
Met	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Asn	Val
				95					100					105
His	Arg	Val	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Leu	Glu	Thr	Gln	Pro	Pro
				110					115					120
Gly	Gly	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Ile	Cys	Ser
				125					130					135
Val	Ala	Met	Gly	Thr	Gly	Asp	Ile	Thr	Phe	Leu	Trp	Tyr	Lys	Gly
				140					145					150
Ala	Val	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Ser	Lys	Thr	Gln	Arg	Ser	Leu	Thr
				155					160					165
Ala	Glu	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ser	Val	Arg	Glu	Ser	Asp	Ala	Glu	Gln
				170					175					180
Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro	Ser	Gly
				185					190					195
Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	Leu
				200					205					210
Met	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Leu
				215					220					225
Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr
				230					235					240
Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Pro
				245					250					255
Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	His
				260					265					270
Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln
				275					280					285
Arg	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Val	Pro	Thr	Gly	Ala
				290					295					300
Arg	Ser	Asn	His	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser
				305					310					315
Thr	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Leu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Leu
				320					325					330

Lys	Arg	Lys	Ile	Gly	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Pro	Leu	Arg	Ser	335	340	345
Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Tyr	Leu	Asn	Ser	Pro	350	355	360
Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Gln	Pro	Ile	Tyr	Glu	Asn	Val	Asn	Val	Val	365	370	375
Ser	Gly	Asp	Glu	Val	Tyr	Ser	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Pro	Glu	380	385	390
Gln	Glu	Ser	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Thr	His	Met	Glu	Asp	395	400	405
Lys	Val	Ser	Leu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Arg	Leu	Arg	Lys	Ala	Asn	Ile	410	415	420
Thr	Asp	Val	Asp	Tyr	Glu	Asp	Ala	Met							425		

<210> 35

<211> 977

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met	Leu	Leu	Trp	Val	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Val	Ser	Gly	1	5	10	15
Gln	Phe	Ala	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Ile	Ile	Phe	Leu	Gln	Pro	Pro	20	25	30	
Trp	Thr	Thr	Val	Phe	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	35	40	45	
Gly	Phe	Arg	Phe	Tyr	Ser	Pro	Gln	Lys	Thr	Lys	Trp	Tyr	His	Arg	50	55	60	
Tyr	Leu	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Asn	Ile	Leu	65	70	75	
Glu	Val	Gln	Glu	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	80	85	90	
Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	His	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Ala	Ser	Leu	95	100	105	
Ile	Leu	Gln	Ala	Pro	Leu	Ser	Val	Phe	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Val	110	115	120	
Leu	Arg	Cys	Arg	Ala	Lys	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	125	130	135	
Tyr	Lys	Asn	Asp	Asn	Val	Leu	Ala	Phe	Leu	Asn	Lys	Arg	Thr	Asp	140	145	150	
Phe	His	Ile	Pro	His	Ala	Cys	Leu	Lys	Asp	Asn	Gly	Ala	Tyr	Arg	155	160	165	
Cys	Thr	Gly	Tyr	Lys	Glu	Ser	Cys	Cys	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Thr				

170										175					180				
Val	Lys	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Pro	Phe	Thr	Arg	Pro	Val	Leu	Arg					
				185					190					195					
Ala	Ser	Ser	Phe	Gln	Pro	Ile	Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Thr					
				200					205					210					
Cys	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	Leu	Arg					
				215					220					225					
Phe	Arg	Phe	Phe	Arg	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Trp	Ser					
				230					235					240					
Leu	Ser	Pro	Asn	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Met	Trp	Ser	Lys	Asp	Ser					
				245					250					255					
Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Lys	Ala	Ala	Thr	Met	Pro	His	Ser	Val	Ile					
				260					265					270					
Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Trp	Ile	Gln	Val	Gln	Ile	Pro	Ala	Ser					
				275					280					285					
His	Pro	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Phe	Glu					
				290					295					300					
Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	Thr	Gln	Glu	Asp	Ser	Leu					
				305					310					315					
Arg	Thr	Leu	Tyr	Arg	Phe	Tyr	His	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Arg	His					
				320					325					330					
Lys	Ser	Val	Arg	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu					
				335					340					345					
Thr	Thr	Glu	Asn	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly					
				350					355					360					
Leu	Gly	Ala	Lys	Pro	Ser	Lys	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Val					
				365					370					375					
Pro	Val	Ser	His	Pro	Val	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu					
				380					385					390					
Ile	Phe	Glu	Gly	Ala	Lys	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Gln	Arg					
				395					400					405					
Gly	Ser	Leu	Pro	Ile	Leu	Tyr	Gln	Phe	His	His	Glu	Asp	Ala	Ala					
				410					415					420					
Leu	Glu	Arg	Arg	Ser	Ala	Asn	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Ile	Ser					
				425					430					435					
Phe	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ala					
				440					445					450					
Asp	Asn	Gly	Phe	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Lys	Ala	Val	Ser	Leu	Ser					
				455					460					465					
Ile	Thr	Val	Pro	Val	Ser	His	Pro	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Ala					
				470					475					480					

Glu	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	
				485					490					495	
Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Gln	Phe	Tyr	His	Glu	
				500					505					510	
Asp	Met	Pro	Leu	Trp	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Val	
				515					520					525	
Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	
				530					535					540	
Cys	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly	Phe	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Glu	Val	Val	
				545					550					555	
Ser	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Leu	
				560					565					570	
Arg	Val	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	
				575					580					585	
His	Cys	Glu	Ala	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr	Trp	Phe	
				590					595					600	
Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Ser	Gly	
				605					610					615	
Gly	Glu	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	His	Ser	Gly	
				620					625					630	
Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Val	Ala	Gln	His	Ser	
				635					640					645	
Asp	Thr	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ile	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	
				650					655					660	
Leu	Thr	Phe	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Leu	
				665					670					675	
Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	
				680					685					690	
Tyr	Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	
				695					700					705	
Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	
				710					715					720	
His	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu	Ala	
				725					730					735	
Gln	Arg	Ser	Glu	Met	Val	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Pro	Val	Ser	
				740					745					750	
Arg	Pro	Val	Leu	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	His	Ala	Ala	Val	
				755					760					765	
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	
				770					775					780	

Leu	Ile	Leu	Tyr	Arg	Phe	Phe	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn		785	790	795
Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr		800	805	810
Ala	Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Leu		815	820	825
Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu		830	835	840
Thr	Ala	Asn	Arg	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Ala	Gly	Gly		845	850	855
Leu	Leu	Ser	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr		860	865	870
Cys	Trp	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ser	Asp	Pro		875	880	885
Ala	Arg	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	Thr	Tyr	His		890	895	900
Asn	Val	Pro	Ala	Trp	Glu	Glu	Leu	Gln	Pro	Val	Tyr	Thr	Asn	Ala		905	910	915
Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Asn	Val	Val	Tyr	Ser	Glu	Val	Arg	Ile	Ile		920	925	930
Gln	Glu	Lys	Lys	Lys	His	Ala	Val	Ala	Ser	Asp	Pro	Arg	His	Leu		935	940	945
Arg	Asn	Lys	Gly	Ser	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Lys	Val	Ala		950	955	960
Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Pro		965	970	975
His	Arg																	

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4975278 A [0005]
- EP 1391213 A [0005]
- US 4970198 A [0006]
- US 5079233 A [0006]
- US 5585089 A [0006] [0231]
- US 5606040 A [0006]
- US 5693762 A [0006]
- US 5739116 A [0006]
- US 5767285 A [0006]
- US 5773001 A [0006]
- US 5635483 A [0007] [0201] [0384]
- WO 2004010957 A [0008]
- US 20040018194 A [0008]
- WO 04032828 A [0008]
- WO 03043583 A [0008]
- US 5677171 A [0011] [0345]
- WO 9400136 A [0012]
- US 5783186 A [0012]
- US 5183884 A [0013]
- US 5480968 A [0013]
- EP 599274 A [0013]
- US 5821337 A [0014] [0015] [0044] [0056] [0577] [0600]
- US 6054297 A [0014]
- US 6407213 B [0014]
- US 6639055 B [0014]
- US 4816567 A [0027] [0028] [0231] [0288] [0297] [0299]

- US 5641869 A [0039]
- US 5500362 A [0044]
- EP 404097 A [0054]
- WO 9311161 A [0054]
- WO 9321319 A [0056]
- WO 9845479 A [0070]
- US 4933294 A [0070]
- WO 9105264 A [0070]
- US 5401638 A [0070]
- US 4943533 A [0076]
- WO 9640210 A [0076]
- US 5212290 A [0076]
- US 5891996 A [0076]
- WO 9850433 A [0076]
- EP 659439 A2 [0076]
- US 5804396 A [0077]
- WO 9909016 A [0077]
- WO 9843960 A [0077]
- WO 9738983 A, Warner Lambert [0077]
- WO 9906378 A, Warner Lambert [0077]
- WO 9906396 A, Warner Lambert [0077]
- WO 9630347 A [0077]
- WO 9633978 A [0077]
- WO 963397 A [0077]
- WO 9633980 A [0077]
- US 5780588 A [0201] [0384]
- US 5663149 A [0201]
- WO 9308829 A [0224] [0308]
- WO 9404690 A [0226] [0309]
- EP 0105360 A [0228]
- WO 8303679 A [0228]
- EP 0217577 A [0228]
- US 4946778 A [0230]
- US 4816397 A, Boss [0231]
- WO 8702671 A [0231]

- EP 184187 A [0231]
- EP 171496 A [0231]
- EP 173494 A [0231]
- WO 8601533 A [0231]
- EP 12023 A [0231]
- US 5225539 A [0231]
- US 5625126 A [0232]
- US 5633425 A [0232]
- US 5569825 A [0232]
- US 5661016 A [0232]
- US 5545806 A [0232]
- WO 9734631 A [0236]
- WO 2004063362 A [0248]
- WO 2003042661 A [0248]
- US 2003134790 A1 [0248]
- WO 2002102235 A [0248]
- WO 2003055443 A [0248]
- WO 200299122 A [0248]
- WO 2003029421 A [0248]
- WO 2003024392 A [0248]
- WO 200298358 A [0248]
- WO 200254940 A [0248]
- WO 200259377 A [0248]
- WO 200230268 A [0248]
- WO 200148204 A [0248]
- WO 2004048938 A [0248]
- WO 2004032842 A [0248]
- WO 2003016475 A [0248]
- WO 200278524 A [0248]
- WO 200299074 A [0248]
- WO 200286443 A [0248]
- WO 2003003906 A [0248]
- WO 200264798 A [0248]
- WO 200014228 A [0248]
- US 2003224454 A [0248]

- WO 2003025138 A [0248]
- WO 2004065577 A [0248]
- WO 2004027049 A [0248]
- EP 1394274 A [0248]
- WO 2004016225 A [0248]
- US 2003157089 A [0248]
- US 2003185830 A [0248]
- US 2003064397 A [0248]
- WO 200289747 A [0248]
- WO 2003022995 A [0248]
- WO 2004045553 A [0248]
- WO 200292836 A [0248]
- WO 200283866 A [0248]
- US 2003124140 A [0248]
- US 2003091580 A [0248]
- WO 200206317 A [0248]
- WO 2003101283 A [0248]
- WO 2002101075 A [0248]
- WO 200271928 A [0248]
- WO 9410312 A [0248]
- WO 2004022778 A [0248]
- EP 875569 A [0248]
- WO 200157188 A [0248]
- WO 200175177 A [0248]
- WO 2004000997 A [0248]
- WO 2003003984 A [0248]
- WO 200206339 A [0248]
- WO 200188133 A [0248]
- WO 2003054152 A [0248]
- WO 2003101400 A [0248]
- US 2003129192 A [0248]
- US 2004044180 A [0248]
- US 2004044179 A [0248]
- US 2003096961 A [0248]
- US 2003232056 A [0248]

- WO 2003105758 A [0248]
- US 2003206918 A [0248]
- EP 1347046 A [0248]
- WO 2003025148 A [0248]
- WO 2004045516 A [0248]
- WO 2004040000 A [0248]
- WO 2003087768 A [0248]
- WO 200261087 A [0248]
- WO 2003016494 A [0248]
- WO 200198351 A [0248]
- EP 522868 A [0248]
- WO 200177172 A [0248]
- US 2003109676 A [0248]
- US 6518404 B [0248]
- US 5773223 A [0248]
- WO 2004001004 A [0248]
- WO 2003104275 A [0248]
- WO 2004046342 A [0248]
- WO 2003083074 A [0248]
- WO 2003018621 A [0248]
- WO 200166689 A [0248]
- WO 2003087306 A [0248]
- WO 200272596 A [0248]
- WO 200172962 A [0248]
- WO 2003104270 A [0248]
- US 2004005598 A [0248]
- US 2003060612 A [0248]
- WO 200226822 A [0248]
- WO 200216429 A [0248]
- US 2003143557 A [0248]
- WO 200040614 A [0248]
- WO 200210382 A [0248]
- US 2003219806 A [0248]
- WO 200162794 A [0248]
- US 2003224411 A [0248]

- WO 2003083041 A [0248]
- WO 2003034984 A [0248]
- WO 200288170 A [0248]
- WO 200216413 A [0248]
- WO 200222808 A [0248]
- US 5854399 A [0248]
- US 5792616 A [0248]
- WO 2004045520 A [0248]
- US 2004005538 A [0248]
- WO 2003062401 A [0248]
- WO 9102536 A [0248]
- WO 2004020595 A [0248]
- US 2004101874 A [0248]
- US 2002150573 A [0248]
- US 5644033 A [0248]
- WO 2003048202 A [0248]
- WO 99558658 A [0248]
- US 6534482 B [0248]
- WO 200055351 A [0248]
- WO 2003077836 A [0248]
- WO 200138490 A [0248]
- WO 2003097803 A [0248]
- WO 2003089624 A [0248]
- WO 2004009622 A [0248]
- WO 2003081210 A [0248]
- WO 2003089904 A [0248]
- US 2003118592 A [0248]
- WO 2003008537 A [0248]
- WO 2003055439 A [0248]
- WO 2003025228 A [0248]
- WO 200222636 A [0248]
- WO 200212341 A [0248]
- WO 200213847 A [0248]
- WO 200214503 A [0248]
- WO 200153463 A [0248]

- WO 200141787 A [0248]
- WO 200044899 A [0248]
- WO 200020579 A [0248]
- US 5869445 A [0248]
- WO 9630514 A [0248]
- EP 1439393 A [0248]
- WO 2004043361 A [0248]
- WO 2004022709 A [0248]
- WO 200100244 A [0248]
- WO 2004063709 A [0248]
- WO 2004044178 A [0248]
- WO 2004031238 A [0248]
- WO 200260317 A [0248]
- JP 05003790 B [0248]
- WO 9946284 A [0248]
- US 2004005320 A [0248]
- WO 2003029262 A [0248]
- WO 2003002717 A [0248]
- WO 200222153 A [0248]
- US 2002042366 A [0248]
- WO 200146261 A [0248]
- WO 200146232 A [0248]
- WO 9837193 A [0248]
- US 2003186372 A [0248]
- US 2003186373 A [0248]
- US 2003119131 A [0248]
- US 2003119122 A [0248]
- US 2003119126 A [0248]
- US 2003119121 A [0248]
- US 2003119129 A [0248]
- US 2003119130 A [0248]
- US 2003119128 A [0248]
- US 2003119125 A [0248]
- WO 200202634 A [0248]
- WO 200053216 A [0248]

- WO 2004065576 A [0248]
- WO 2004020583 A [0248]
- WO 2003004529 A [0248]
- US 20040101899 A [0248]
- WO 2003104399 A [0248]
- WO 2004000221 A [0248]
- US 2003165504 A [0248]
- US 2003065143 A [0248]
- WO 200210187 A [0248]
- WO 200194641 A [0248]
- WO 200202624 A [0248]
- US 2002034749 A [0248]
- WO 200202587 A [0248]
- WO 200140269 A [0248]
- WO 200036107 A [0248]
- WO 2004053079 A [0248]
- WO 2003004989 A [0248]
- WO 0116318 A [0248]
- US 2004018553 A [0248]
- WO 200281646 A [0248]
- WO 200140309 A [0248]
- US 2001055751 A [0248]
- WO 200032752 A [0248]
- WO 9851805 A [0248]
- WO 9851824 A [0248]
- WO 9840403 A [0248]
- WO 2003000842 A [0248]
- WO 2003023013 A [0248]
- US 2003194704 A [0248]
- WO 2004058309 A [0248]
- WO 2004011611 A [0248]
- WO 2003045422 A [0248]
- WO 2003014294 A [0248]
- WO 2003035846 A [0248]
- WO 200294852 A [0248]

- WO 200238766 A [0248]
- WO 200224909 A [0248]
- US 2003157113 A [0248]
- WO 2003072036 A [0248]
- WO 2003088808 A [0248]
- US 20030228319 A [0248]
- WO 9958658 A [0248]
- WO 9207574 A [0248]
- WO 2004015426 A [0248]
- US 2003105292 A [0248]
- US 6555339 B [0248]
- WO 200172830 A [0248]
- WO 200022129 A [0248]
- WO 9928468 A [0248]
- US 5440021 A [0248]
- WO 9428931 A [0248]
- WO 9217497 A [0248]
- US 6153408 A [0248]
- US 5976551 A [0248]
- US 6011146 A [0248]
- WO 2004047749 A [0248]
- WO 2003072035 A [0248]
- WO 200222660 A [0248]
- WO 2003093444 A [0248]
- WO 2003029277 A [0248]
- WO 2004042346 A [0248]
- WO 2003026493 A [0248]
- WO 200075655 A [0248]
- US 2002193567 A [0248]
- WO 9707198 A [0248]
- WO 2003083047 A [0248]
- WO 9744452 A [0248]
- WO 200012130 A [0248]
- WO 04045516 A [0249]
- WO 03000113 A [0249]

- WO 02016429 A [0249]
- WO 0216581 A [0249]
- WO 03024392 A [0249]
- WO 04016225 A [0249]
- WO 0140309 A [0249]
- US 520842 P [0249]
- WO 8605807 A [0263]
- WO 8901036 A [0263]
- US 5122464 A [0263]
- US 4694778 A [0265]
- US 5591669 A [0304]
- US 5589369 A [0304]
- US 5545807 A [0304]
- US 5565332 A [0305]
- US 5573905 A [0305]
- US 5567610 A [0305]
- US 5229275 A [0305]
- US 338366 A [0305]
- WO 9316185 A [0306]
- US 5571894 A [0306]
- US 5587458 A [0306]
- US 5641870 A [0306]
- US 5731168 A [0310]
- US 5739277 A [0323]
- US 5047335 A [0329]
- US 5510261 A [0329]
- US 5278299 A [0329]
- US 6632979 B [0331] [0364]
- US 5766863 A [0342]
- US 5583024 A [0349]
- US 5674713 A [0349]
- US 5700670 A [0349]
- US 6602677 B [0349]
- WO 9813059 A, Firestone [0428]
- US 6214345 B, Firestone [0487] [0488]

- WO 02088172 A [0493]
- US 60598899 B [0601]
- US 60557116 B [0601]
- US 60518534 B [0601]

Documentos de não patente citados na descrição

- **SYRIGOS ; EPEKETOS.** *Anticancer Research*, 1999, vol. 19, 605-614 [0005]
- **NICULESCU-DUV ; SPRINGER.** *Adv. Drg. Del. Rev.*, 1997, vol. 26, 151-172 [0005]
- **BALDWIN et al.** *Lancet*, 15 March 1986, 603-05 [0005]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **THORPE et al.** *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. 1985, 475-506 [0005]
- **ROWLAND et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1986, vol. 21, 183-87 [0005]
- **KERR et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8 (6), 781-784 [0005]
- **MANDLER et al.** *Jour. of the Nat. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92 (19), 1573-1581 [0005]
- **MANDLER et al.** *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, 2000, vol. 10, 1025-1028 [0005]
- **MANDLER et al.** *Bioconjugate Chem.*, 2002, vol. 13, 786-791 [0005]
- **LIU et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, 8618-8623 [0005]
- **LODE et al.** *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 2928 [0005]
- **HINMAN et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0005]
- Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. **MEYER, D.L. ; SENTER, P.D.** *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2003, vol. 38, 229-237 [0005]
- **WISEMAN et al.** *Eur. Jour. Nucl. Med.*, 2000, vol. 27 (7), 766-77 [0006]

- **WISEMAN et al.** *Blood*, 2002, vol. 99 (12), 4336-42 [0006]
- **WITZIG et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2002, vol. 20 (10), 2453-63 [0006]
- **WITZIG et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2002, vol. 20 (15), 3262-69 [0006]
- *Drugs of the Future*, 2000, vol. 25 (7), 686 [0006]
- **CHARI et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0006]
- **PETTIT et al.** *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, 9151 [0007]
- **NAKAMURA et al.** *Tetrahedron Letters*, 1995, vol. 36, 5059-5062 [0007]
- **SONE et al.** *Jour. Org Chem.*, 1995, vol. 60, 4474 [0007]
- **PETTIT et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1998, vol. 13, 243-277 [0007] [0384]
- **G. R. PETTIT.** *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1997, vol. 70, 1-79 [0007]
- **KLUSSMAN et al.** *Bioconjugate Chemistry*, 2004, vol. 15 (4), 765-773 [0008] [0431]
- **DORONINA et al.** *Nature Biotechnology*, 2003, vol. 21 (7), 778-784 [0008]
- **FRANCISCO et al.** *Blood*, 2003, vol. 102 (4), 1458-1465 [0008]
- **MAO et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64 (3), 781-788 [0008]
- **BHASKAR et al.** *Cancer Res.*, 2003, vol. 63, 6387-6394 [0008]
- **SETER et al.** *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 28 March 2004, vol. 45 [0009]
- **HUDZIAK et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0011]
- **FENDLY et al.** *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0011] [0593] [0598]
- **KOTTS et al.** *In vitro*, 1990, vol. 26 (3), 59A [0011]

- **SARUP et al.** *Growth Regulation*, 1991, vol. 1, 72-82 [0011]
- **SHEPARD et al.** *J. (1991) Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11 (3), 117-127 [0011]
- **KUMAR et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11 (2), 979-986 [0011]
- **LEWIS et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0011] [0015] [0599]
- **PIETRAS et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0011]
- **VITETTA et al.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 5301-5309 [0011]
- **SLIWKOWSKI et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0011] [0040]
- **SCOTT et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 14300-5 [0011]
- **D'SOUZA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 7202-7206 [0011]
- **LEWIS et al.** *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0011] [0596]
- **SCHAEFER et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 1385-1394 [0011] [0039] [0344] [0599]
- **TAGLIABUE et al.** *Int. J. Cancer*, 1991, vol. 47, 933-937 [0012]
- **MCKENZI et al.** *Oncogene*, 1989, vol. 4, 543-548 [0012]
- **MAIER et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5361-5369 [0012]
- **BACUS et al.** *Molecular Carcinogenesis*, 1990, vol. 3, 350-362 [0012]
- **STANCOVSKI et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8691-8695 [0012] [0284]
- **BACUS et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2580-2589 [0012]
- **XU et al.** *Int. J. Cancer*, 1993, vol. 53, 401-408 [0012]

- **KASPRZYK et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0012]
- **HANCOCK et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4575-4580 [0012]
- **SHAWVER et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 1367-1373 [0012]
- **ARTEAGA et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 3758-3765 [0012]
- **HARWERTH et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15160-15167 [0012]
- **KLAPPER et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 14, 2099-2109 [0012]
- **KRAU.S. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 9193-9197 [0013]
- **PLOWMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0013]
- **PLOWMAN et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 473-475 [0013]
- **COUSSENS L et al.** *Science*, 1985, vol. 230, 1132-9 [0014]
- **SLAMON DJ et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 707-12 [0014]
- **PRESS MF et al.** *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 4960-70 [0014]
- **HUDZIAK RM et al.** *Mol Cell Biol*, 1989, vol. 9, 1165-72 [0014]
- **LEWIS GD et al.** *Cancer Immunol Immunother*, 1993, vol. 37, 255-63 [0014]
- **BASELGA J et al.** *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 2825-2831 [0014]
- **HOTALING TE et al.** *Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res*, 1996, vol. 37, 471 [0014]
- **PEGRAM MD et al.** *Proc Am Assoc Cancer Res*, 1997, vol. 38, 602 [0014]
- **BASELGA et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0014]

- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0015]
- **COBLEIGH et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol. 17, 2639-2648 [0015]
- **JANEWAY, C. ; S, P. ; WALPORT, M. ; SHLOM-CHIK.** *Immuno Biology*,. Garland Publishing, 2001 [0025]
- **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0027] [0288]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0027] [0296] [0305]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0027] [0305]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0028]
- **SEMBA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0036]
- **YAMAMOTO et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0036]
- **SAVAGE et al.** *J. Biol. Chem.*, vol. 247, 7612-7621 [0038]
- **MARQUARDT et al.** *Science*, 1984, vol. 223, 1079-1082 [0038]
- **SHOYAB et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 1074-1076 [0038]
- **KIMURA et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 257-260 [0038]
- **COOK et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 2547-2557 [0038]
- **SHING et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 1604-1607 [0038]
- **SASADA et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 190, 1173 [0038]
- **HIGASHIYAMA et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 936-939 [0038]
- **TOYODA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7495-7500 [0038]
- **KOMURASAKI et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 2841-2848 [0038]

- **CARRAWAY et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 512-516 [0038]
- **ZHANG et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 9562-9567 [0038]
- **HARARI et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 2681-89 [0038]
- **KANNAN et al.** *J. Biol. Chem*, 1997, vol. 272 (6), 3330-3335 [0038]
- **JONES et al.** *FEBS Letters*, 1999, vol. 447, 227-231 [0038]
- **MARCHIONNI et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 312-318 [0039]
- **HOLMES et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 1205-1210 [0039] [0597]
- **PELES et al.** *Cell*, 1992, vol. 69, 205-216 [0039]
- **FALLS et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 801-815 [0039]
- **HO et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 14523-14532 [0039]
- **KINET.** *Annu. Re v. Immunol*, 1991, vol. 9, 457-92 [0044]
- **CLYNES et al.** *Prco. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 652-656 [0044]
- **M. IN DAËRON.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0045]
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0045]
- **CAPEL et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0045]
- **DE HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0045]
- **GUYER et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0045]
- **KIM et al.** *J. Immunol*, 1994, vol. 24, 249 [0045]
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0046]
- **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health*, 1991 [0047] [0303]
- **CHOTHIA ; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917

[0048]

- **PLÜCKTHUN**. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0053]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0054] [0313]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0055] [0299]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0055]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0055]
- **SIAS et al.** *J. Immunol. Methods*, 1990, vol. 132, 73-80 [0070]
- **HUDZIAK et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7159-7163 [0071]
- **SLAMON et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0071]
- **SLAMON et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0071]
- **AGNEW**. *Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0074]
- **WILMAN**. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0080]
- Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA et al.** Directed Drug Delivery. Humana Press, 1985, 247-267 [0080]
- **PAQUETTE, LEO A.** Principles of Modern Heterocyclic Chemistry. W.A. Benjamin, 1968 [0098]
- The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs. John Wiley & Sons, 1950, vol. 13, 14, 16, 19, 28 [0098]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, 5566 [0098]
- McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms. McGraw-Hill Book Company, 1984 [0108]
- **ELIEL, E. ; WILEN, S.** Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons, Inc, 1994 [0108]
- Effect of drug loading on the pharmacology, pharma-

cokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate. Proceedings of the AACR. American Association for Cancer Research, 27 March 2004, vol. 45 [0172]

- Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates. **ALLEY, S.C. et al.** Proceedings of the AACR. American Association for Cancer Research, 27 March 2004, vol. 45 [0172]
- **KANEKO, T. et al.** *Bioconjugate Chem*, 1991, vol. 2 133-41 [0181]
- **TOKI et al.** *J Org. Chem.*, 2002, vol. 67, 1866-1872 [0195]
- **HAY et al.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, vol. 9 2237 [0197]
- **RODRIGUES et al.** *Chemistry Biology*, 1995, vol. 2 223 [0197]
- **STORM et al.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, vol. 94 5815 [0197]
- **AMSBERRY et al.** *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, 5867 [0197]
- **KINGSBURY et al.** *J. Med. Chem.*, 1984, vol. 27 1447 [0197]
- **WOYKE et al.** *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2001, vol. 45 (12), 3580-3584 [0201]
- **PETTIT et al.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998 vol. 42, 2961-2965 [0201]
- **LAGUZZA et al.** *J. Med. Chem.*, 1989, vol. 32 (3) 548-55 [0219]
- **COLIGAN et al.** *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, 2002, vol. 2 [0219]
- **KÖHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256 495-497 [0222]
- **KOZBOR et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0222] [0262]
- **COLE et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*.

Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0222] [0262]

- **TENG et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1983, vol 80, 7308-7312 [0223]
- **KOZBOR et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4 72-79 [0223]
- **OLSSON et al.** *Meth. Enzymol.*, 1982, vol. 92, 3-16 [0223]
- **MILSTEIN et al.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0224]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10 3655-3659 [0224] [0308]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol 121, 210 [0227] [0309]
- **RODRIGUES et al.** *J. of Immunology*, 1993, vol. 151 6954-6961 [0227]
- **CARTER et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10 163-167 [0227] [0306]
- **CARTER et al.** *J. of Hematotherapy*, 1995, vol. 4 463-470 [0227]
- **MERCHANT et al.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol 16, 677-681 [0227]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institute of Health, 1991 [0229]
- **KABAT E et al.** *J. of Immunology*, 1980, vol. 125 (3) 961-969 [0229]
- **BIRD.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-42 [0230] [0265]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol 85, 5879-5883 [0230] [0265]
- **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 334, 544-54 [0230] [0265]
- **BERTER et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0231]
- **LIU et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3439-3443 [0231]
- **LIU et al.** *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 3521-3526 [0231]

- **SUN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 214-218 [0231]
- **NISHIMURA et al.** *Cancer. Res.*, 1987, vol. 47, 999-1005 [0231]
- **WOOD et al.** *Nature*, 1985, vol. 314, 446-449 [0231]
- **SHAW et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, vol. 80, 1553-1559 [0231]
- **MORRISON.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202-1207 [0231]
- **OI et al.** *BioTechniques*, 1986, vol. 4, 214 [0231]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 552-525 [0231]
- **VERHOEYAN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534 [0231]
- **BEIDLER et al.** *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 4053-4060 [0231]
- **LONBERG ; HUSZAR.** *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0232]
- **JESPERS et al.** *Biotechnology*, 1994, vol. 12, 899-903 [0233]
- **HOOGENBOOM ; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0233]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0233]
- The rise of monoclonal antibodies as therapeutics. **QUAN, M. P. ; CARTER, P.** *Anti-IgE and Allergic Disease.* Marcel Dekker, 2002, 427-469 [0233]
- **TRAIL, P. A ; WILLNER, D. ; LASCH, S. J. ; HENDERSON, A. J. ; HOFSTEAD, S. J. ; CASAZZA, A. M. ; FIRESTONE, R. A. ; HELLSTRÖM, I. ; HELL-STRÖM, K. E.** Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates. *Science*, 1993, vol. 261, 212-215 [0238]
- **GREENFIELD, R. S. ; FIRESTONE, R. A. ; MO-SURE, K. ; KADOW, D. F ; YANG, M. B. ; HELL-STROM, K. E. ; HELLSTROM, I.** Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconju-gates. *Cancer Research*, 1997, vol. 57, 100-105 [0238]

- **FRANCISCO, J. A. ; DONALDSON, K. L. ; CHACE, D. ; SIEGALL, C. B. ; WAHL, A. F.** Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 3225-3231 [0238]
- **BOWEN, M. A. ; OLSEN, K. J. ; CHENG, L. ; AVILA, D. ; PODACK, E. R.** Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 5896-5906 [0238]
- **WAHL et al.** *Cancer Res.*, 2002, vol. 62 (13), 3736-42 [0238]
- **FRANKE, A. E. ; SIEVERS, E. L. ; SCHEINBERG, D. A.** Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review. *Cancer Biother Radiopharm.*, 2000, vol. 15, 459-76 [0238]
- **MURRAY, J. L.** Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age. *Semin Oncol.*, 2000, vol. 27, 64-70 [0238]
- **BREITLING, F. ; DUBEL, S.** Recombinant Antibodies. John Wiley, and Sons, 1998 [0238]
- **TEN DIJKE, P. et al.** *Science*, 1994, vol. 264 (5155), 101-104 [0248]
- *Oncogene*, 1997, vol. 14 (11), 1377-1382 [0248]
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 255 (2), 283-288 [0248]
- *Nature*, 1998, vol. 395 (6699), 288-291 [0248]
- **GAUGITSCH, H.W. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267 (16), 11267-11273 [0248]
- *Cancer Res.*, 2001, vol. 61 (15), 5857-5860 [0248]
- **HUBERT, R.S. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, vol. 96 (25), 14523-14528 [0248]
- *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (29), 27371-27375 [0248]
- **YAMAGUCHI, N. et al.** *Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (2), 805-808 [0248]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, vol. 96 (20),

11531-11536 [0248]

- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, vol. 93 (1), 136-140 [0248]
- *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (37), 21984-21990 [0248]
- *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (22), 19665-19672 [0248]
- *Genomics*, 1999, vol. 62 (2), 281-284 [0248]
- **FEILD, J.A. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 258 (3), 578-582 [0248]
- **NAGASE T. et al.** *DNA Res.*, 2000, vol. 7 (2), 143-150 [0248]
- **NAKAMUTA M. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 177, 34-39 [0248]
- **OGAWA Y. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 178, 248-255 [0248]
- **ARAI H. et al.** *Jpn. Circ. J.*, 1992, vol. 56, 1303-1307 [0248]
- **ARAI H. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 3463-3470 [0248]
- **SAKAMOTO A. ; YANAGISAWA M. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 178, 656-663 [0248]
- **ELSHOURBAGY N.A. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 3873-3879 [0248]
- **HAENDLER B. et al.** *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1992, vol. 20, s1-S4 [0248]
- **TSUTSUMI M. et al.** *Gene*, 1999, vol. 228, 43-49 [0248]
- **STRAUSBERG R.L. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, vol. 99, 16899-16903 [0248]
- **BOURGEOIS C. et al.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, vol. 82, 3116-3123 [0248]
- **OKAMOTO Y. et al.** *Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 21589-21596 [0248]
- **VERHEIJ J.B. et al.** *Am. J. Med. Genet.*, 2002, vol. 108, 223-225 [0248]

- **HOFSTRA R.M.W. et al.** *Eur. J. Hum. Genet.*, 1997, vol. 5, 180-185 [0248]
- **PUFFENBERGER E.G., et al.** *Cell*, 1994, vol. 79, 1257-1266 [0248]
- **ATTIE T. et al.** *Hum. Mol. Genet.*, 1995, vol. 4, 2407-2409 [0248]
- **AURICCHIO A. et al.** *Hum. Mol. Genet.*, 1996, vol. 5, 351-354 [0248]
- **AMIEL J. et al.** *Hum. Mol. Genet.*, 1996, vol. 5, 355-357 [0248]
- **HOFSTRA R.M.W. et al.** *Nat. Genet.*, 1996, vol. 12, 445-447 [0248]
- **SVENSSON P.J. et al.** *Hum. Genet.*, 1998, vol. 103, 145-148 [0248]
- **FUCHS S. et al.** *Mol. Med.*, 2001, vol. 7, 115-124 [0248]
- **PINGAULT V. et al.** *Hum. Genet.*, 2002, vol. 111, 198-206 [0248]
- *Lab. Invest.*, 2002, vol. 82 (11), 1573-1582 [0248]
- **XU,X.Z. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, vol. 98 (19), 10692-10697 [0248]
- *Cell*, 2002, vol. 109 (3), 397-407 [0248]
- *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278 (33), 30813-30820 [0248]
- **CICCODICOLA,A. et al.** *EMBO J.*, 1989, vol. 8 (7), 1987-1991 [0248]
- *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, vol. 49 (3), 555-565 [0248]
- **FUJISAKU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264 (4), 2118-2125 [0248]
- **WEIS J.J. et al.** *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 167, 1047-1066 [0248]
- **MOORE M. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, vol. 84, 9194-9198 [0248]
- **BAREL M. et al.** *Mol. Immunol.*, 1988, vol. 35, 1025-1031 [0248]

- **WEIS J.J. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, vol. 83, 5639-5643 [0248]
- **SINHA S.K. et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 5311-5320 [0248]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003, vol. 100 (7), 4126-4131 [0248]
- *Blood*, 2002, vol. 100 (9), 3068-3076 [0248]
- **MULLER et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1992, vol. 22 (6), 1621-1625 [0248]
- *Genome Res.*, 2003, vol. 13 (10), 2265-2270 [0248]
- *Immunogenetics*, 2002, vol. 54 (2), 87-95 [0248]
- *Blood*, 2002, vol. 99 (8), 2662-2669 [0248]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, vol. 98 (17), 9772-9777 [0248]
- **XU, M.J. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, vol. 280 (3), 768-775 [0248]
- **COUSSENS L. et al.** *Science*, 1985, vol. 230 (4730), 1132-1139 [0248]
- **YAMAMOTO T. et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0248]
- **SEMBA K. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0248]
- **SWIERCZ J.M. et al.** *J. Cell Biol.*, 2004, vol. 165, 869-880 [0248]
- **KUHNS J.J. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 36422-36427 [0248]
- **CHO H.-S. et al.** *Nature*, 2003, vol. 421, 756-760 [0248]
- **EHSANI A. et al.** *Genomics*, 1993, vol. 15, 426-429 [0248]
- **BARNETT T. et al.** *Genomics*, 1988, vol. 3, 59-66 [0248]
- **TAWARAGI Y. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, vol. 150, 89-96 [0248]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, vol. 99 (26), 16899-16903 [0248]

- **CLARK H.F., et al.** *Genome Res.*, 2003, vol. 13, 2265-2270 [0248]
- **MUNGALL A.J. et al.** *Nature*, 2003, vol. 425, 805-811 [0248]
- **BLUMBERG H. et al.** *Cell*, 2001, vol. 104, 9-19 [0248]
- **DUMOUTIER L. et al.** *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, 3545-3549 [0248]
- **PARRISH-NOVAK J. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 47517-47523 [0248]
- **PLETNEV S. et al.** *Biochemistry*, 2003, vol. 42, 12617-12624 [0248]
- **SHEIKH F. et al.** *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, 2006-2010 [0248]
- **GARY S.C., et al.** *Gene*, 2000, vol. 256, 139-147 [0248]
- **CLARK H.F. et al.** *Genome Res.*, 2003, vol. 13, 2265-2270 [0248]
- **CHAN, J. ; WATT, V.M.** *Oncogene*, 1991, vol. 6 (6), 1057-1061 [0248]
- *Oncogene*, 1995, vol. 10 (S), 897-905 [0248]
- *Annu. Rev. Neurosci.*, 1998, vol. 21, 309-345 [0248]
- *Int. Rev. Cytol.*, 2000, vol. 196, 177-244 [0248]
- **REITER R.E. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, vol. 95, 1735-1740 [0248]
- **GU Z. et al.** *Oncogene*, 2000, vol. 19, 1288-1296 [0248]
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 275 (3), 783-788 [0248]
- **THOMPSON, J.S. et al.** *Science*, 2001, vol. 293 (5537), 2108-2111 [0248]
- **STAMENKOVIC, I. ; SEED, B.** *Nature*, 1990, vol. 345 (6270), 74-77 [0248]
- **HA et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1526-1531 [0248]
- **MUELLER et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 22, 1621-1625 [0248]
- **HASHIMOTO et al.** *Immunogenetics*, 1994, vol. 40 (4),

287-295 [0248]

- **PREUD'HOMME et al.** *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, vol. 90 (1), 141-146 [0248]
- **YU et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (2), 633-637 [0248]
- **SAKAGUCHI et al.** *EMBO J.*, 1988, vol. 7 (11), 3457-3464 [0248]
- **DOBNER et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1992, vol. 22, 2795-2799 [0248]
- **BARELLA et al.** *Biochem. J.*, 1995, vol. 309, 773-779 [0248]
- **TONNELLE et al.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4 (11), 2839-2847 [0248]
- **JONSSON et al.** *Immunogenetics*, 1989, vol. 29 (6), 411-413 [0248]
- **BECK et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 228, 433-441 [0248]
- **STRAUSBERG et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002, vol. 99, 16899-16903 [0248]
- **SERVENIUS et al.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 8759-8766 [0248]
- **BECK et al.** *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 255, 1-13 [0248]
- **NARUSE et al.** *Tissue Antigens*, 2002, vol. 59, 512-519 [0248]
- **KASAHARA et al.** *Immunogenetics*, 1989, vol. 30 (1), 66-68 [0248]
- **LARHAMMAR et al.** *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260 (26), 14111-14119 [0248]
- **LE et al.** *FEBS Lett.*, 1997, vol. 418 (1-2), 195-199 [0248]
- **TOUCHMAN et al.** *Genome Res.*, 2000, vol. 10, 165-173 [0248]
- **VON HOEGEN et al.** *J. Immunol.*, 1990, vol. 144, 4870-4877 [0248]
- **MIURA et al.** *Genomics*, 1996, vol. 38 (3), 299-304

[0248]

- **MIURA et al.** *Blood*, 1998, vol. 92, 2815-2822 **[0248]**
- **DAVIS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2001, vol. 98 (17), 9772-9777 **[0248]**
- **NAKAYAMA et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 277 (1), 124-127 **[0248]**
- **KUTMEIER et al.** *BioTechniques*, 1994, vol. 17, 242 **[0260]**
- **KOHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 **[0262]**
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 **[0262]**
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624 **[0262]**
- **HANE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 4937 **[0262]**
- **HUTCHINSON et al.** *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, 6551 **[0263]**
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 851-855 **[0264]**
- **NEUBERGER et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 **[0264]**
- **TAKEDA et al.** *Nature*, 1985, vol. 314, 452-454 **[0264]**
- **SKERRA et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 1038-1041 **[0265]**
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1990 **[0267]**
- *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1998 **[0267]**
- **FOECKING et al.** *Gene*, vol. 45, 101 **[0269]**
- **COCKETT et al.** *BioTechnology*, 1990, vol. 8, 2 **[0269]**
- **RUTHER et al.** *EMBO J.*, 1983, vol. 2, 1791 **[0271]**
- **INOUE ; INOUE.** *Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 3101-3109 **[0271]**
- **VAN HEEKE ; SCHUSTER.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 24, 5503-5509 **[0271]**
- **LOGAN ; SHENK.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol.

- 81, 355-359 [0273]
- **BITTNER et al.** *Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 51-544 [0273]
 - **WIGLER et al.** *Cell*, 1977, vol. 11, 223 [0276]
 - **SZYBALSKA ; SZYBALSKI.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 48, 202 [0276]
 - **LOWY et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 817 [0276]
 - **WIGLER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 357 [0276]
 - **O'HARE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 1527 [0276]
 - **MULLIGAN ; BERG.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 2072 [0276]
 - *Clinical Pharmacy*, vol. 12, 488-505 [0276]
 - **WU ; WU.** *Biotherapy*, 1991, vol. 3, 87-95 [0276]
 - **TOLSTOSHEV.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, vol. 32, 573-596 [0276]
 - **MULLIGAN.** *Science*, 1993, vol. 260, 926-932 [0276]
 - **MORGAN ; ANDERSON.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1993, vol. 62, 191-217 [0276]
 - **MAY.** *TIB TECH*, 1993, vol. 11 (5), 155-215 [0276]
 - **SANTERRE et al.** *Gene*, 1984, vol. 30, 147 [0276]
 - *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1993 [0276]
 - **KRIEGLER.** *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual.* Stockton Press, 1990 [0276]
 - *Current Protocols in Human Genetics.* John Wiley & Sons, 1994 [0276]
 - **COLBERRE-GARAPIN et al.** *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 150, 1 [0276]
 - The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells. **BEBBINGTON ; HENTSCHEL.** *DNA cloning.* Academic Press, 1987, vol. 3 [0277]
 - **CROUSE et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 257

[0277]

- **PROUDFOOT.** *Nature*, 1986, vol. 322, 52 [0278]
- **KOHLER.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 2197 [0278]
- **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, 1986, 59-103 [0289] [0293]
- **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0291]
- **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.* Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0291]
- **MUNSON et al.** *Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0292]
- **SKERRA et al.** *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0295]
- **PLÜCKTHUN.** *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0295]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0296]
- **MARKS et al.** *J Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0296]
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0296]
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0296]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0297]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0299]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0299]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0300]
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0300]
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0300]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0300]

- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0304]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0304]
- **BRUGGERMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0304]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0305]
- **JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0305]
- **GRIFFITH et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0305]
- **MORIMOTO et al.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0306]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0306] [0311]
- **MILLSTEIN et al.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0308]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0312]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0313]
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0313]
- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0314]
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0316]
- **CARON et al.** *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0322]
- **SHOPES, B.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0322]
- **WOLFF et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0322]
- **STEVENSON et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0322]
- **JEFFERIS ; LUND.** *Chem. Immunol.*, 1997, vol. 65, 111-128 [0324]

- **WRIGHT ; MORRISON.** *TibTECH*, 1997, vol. 15, 26-32 [0324]
- **BOYD et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 32, 1311-1318 [0324]
- **WITTWE ; HOWARD.** *Biochem.*, 1990, vol. 29, 4175-4180 [0324]
- **WYSS ; WAGNER.** *Current Opin. Biotech.*, 1996, vol. 7, 409-416 [0324]
- **MALHOTRA et al.** *Nature Med.*, 1995, vol. 1, 237-243 [0324]
- **UMANA et al.** *Mature Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0324]
- **HSE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 9062-9070 [0329]
- **SADICK et al.** *Jour. of Pharm. and Biomed. Anal*, 1998 [0343]
- **CROUCH et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1993, vol. 160, 81-88 [0349]
- **CREE et al.** *AntiCancer Drugs*, 1995, vol. 6, 398-404 [0349]
- **FERRAILOLO et al.** *Analytical Methods for Biotechnology Products. Pharmacokinetics of Drugs*, 1994, 85-98 [0357]
- *Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag*, vol. 110 [0357]
- **WEBSTER et al.** *Semin. Cancer Biol.*, 1994, vol. 5, 69-76 [0361]
- **CHILD et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 24335-24341 [0362]
- **NEUBERGER ; WILLIAMS.** *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, 6713 [0362]
- **BUCHMAN ; BERG.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 4395 [0362]
- **BRINSTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 836 [0362]

- **RAO et al.** *Breast Cancer Res. and Treatment*, 1997, vol. 45, 149-158 [0362]
- **MAO et al.** *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, 781-788 [0374]
- **E. SCHRÖDER ; K. LÜBKE.** *The Peptides*. Academic Press, 1965, vol. 1, 76-136 [0379] [0383]
- **PETTIT et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 5463-5465 [0384]
- **PETTIT et al.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1996, vol. 1 (5), 859-863 [0384]
- **MIYAZAKI, K.** *Chem. Charm. Bull.*, 1995, vol. 43 (10), 1706-1718 [0387]
- **GREENE, T.W. ; WUTS, P.G.M.** *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, 1991 [0388]
- **BOWMAN, R.E ; STROUD, H.H.** *J. Chem. Soc.*, 1950, 1342-1340 [0389]
- **PETTIT, G.R. et al.** *Synthesis*, vol. 1 (996), 719-725 [0395]
- **PETTIT, G.R. et al.** *Synthesis*, 1996, 719-725 [0400]
- **WALKER, M.A.** *J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, 5352-5 [0412]
- **FRISCH et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1996, vol. 7, 180-186 [0413]
- **JONES, D.S. et al.** *Tetrahedron Letters*, 2000, vol. 41 (10), 1531-1533 [0418]
- **GILON, C. et al.** *Tetrahedron*, 1967, vol. 23 (11), 4441-4447 [0418]
- *Angew. Chem.*, 1975, vol. 87 (14), 517 [0418]
- **DUBOWCHIK et al.** *Tetrahedron Letters*, 1997, vol. 38, 5257-60 [0420]
- **CROZET, M.P. ; ARCHAIMBAULT, G. ; VANELLE, P. ; NOUGUIER, R.** *Tetrahedron Lett.*, 1985, vol. 26, 5133-5134 [0428]
- **SUN et al.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002, vol. 12, 2213-2215 [0429]
- **SUN et al.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003,

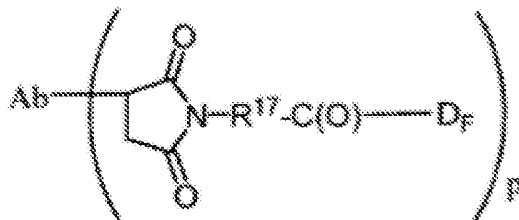
vol. 11, 1761-1768 [0429]

- **GOODSON.** *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, vol. 2, 115-138 [0451]
- **LANGER.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0451]
- **PETTIT, G.R. et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1998, vol. 13, 243-277 [0509]
- **MENDOZA et al.** *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 5485-5488 [0531]
- **HUDZIAK et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1987, vol. 84, 7158-7163 [0593]
- **FENDLY et al.** *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0594]
- **WOFSY et al.** *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.J. Freeman Co, 1980, 287 [0594]
- **HUDZIAK et al.** *Molec. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0595]
- **SUGARMAN et al.** *Science*, 1985, vol. 230, 943-945 [0595]
- **SLIWKOWSKI et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 14661-14665 [0597]

Lisboa, 30 de Março de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um conjugado de anticorpo-fármaco que tem a fórmula:



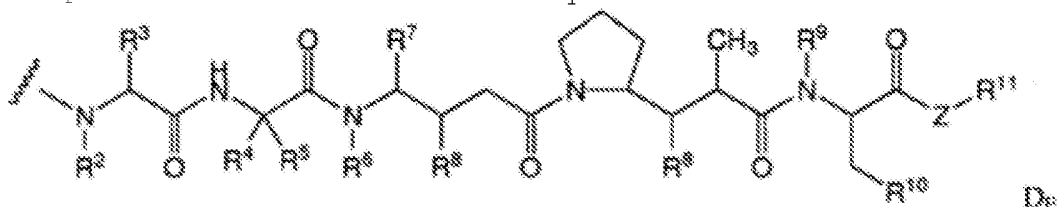
ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

Ab é um anticorpo,

R^{17} é -alquilenos C_1-C_{10} , -carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8)-, -arileno-, -alquilenos C_1-C_{10} -arileno-, -arileno-alquilenos C_1-C_{10} -, -alquilenos C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquilenos C_1-C_{10} -, -heterociclo C_3-C_8 -, -alquilenos C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquilenos C_1-C_{10} -, $-(CH_2CH_2O)_r$ -, ou $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ -; e r é um número inteiro que varia de 1 a 10;

p varia de 1 a cerca de 20, e

D_F é uma Unidade de Fármaco que tem a fórmula:



em que, independentemente em cada localização:

R^2 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^3 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 é selecionado de H e metilo;

ou:

R^4 e R^5 juntamente formam um anel carbocíclico e têm a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$, em que R^a e R^b são independentemente selecionados de H, alquilo C_1-C_8 , e carbociclo C_3-C_8 , e n é selecionado de 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é selecionado de H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilo C_1-C_8 -arilo, alquilo C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , e alquilo C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 é independentemente selecionado de H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é selecionado de H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é selecionado de arilo e heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH, ou NR^{12} , em que R^{12} é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é selecionado de -H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, -heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro variando de 1 a 1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

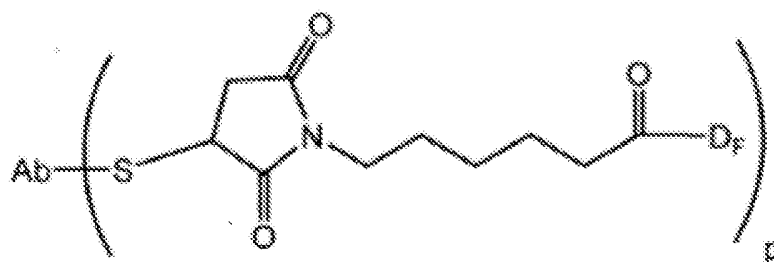
R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 , ou $-(CH_2)_n-COOH$; e

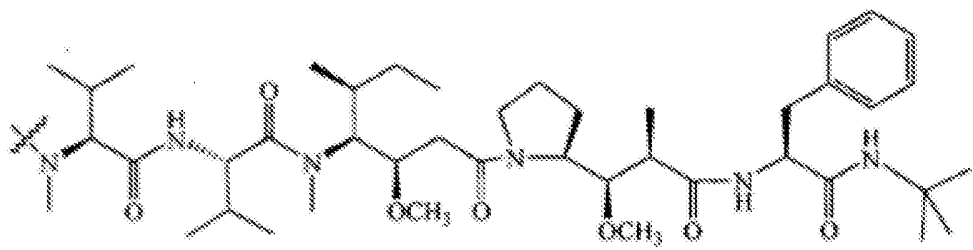
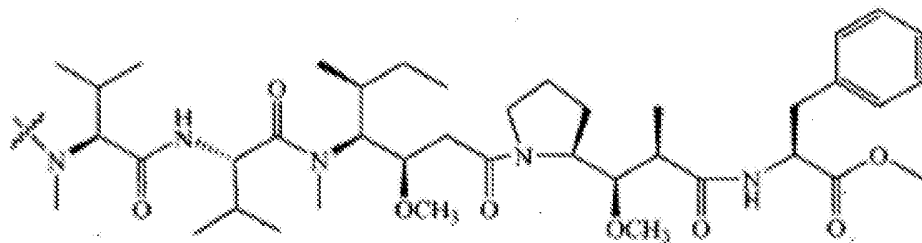
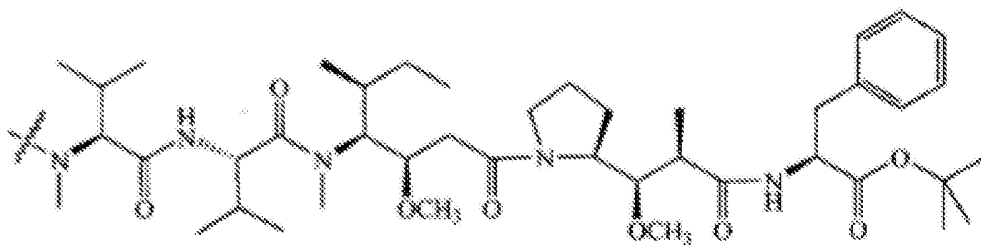
n é um número inteiro que varia de 0 a 6.

2. O composto de conjugado de anticorpo-fármaco da reivindicação 1 que tem a fórmula:

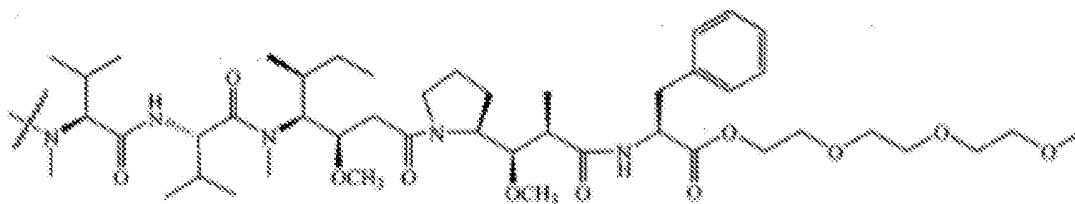


ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

3. O composto de conjugado de anticorpo-fármaco de qualquer das reivindicações anteriores, em que D_F tem a estrutura:



ou



ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo.

4. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que p varia de cerca de 3 a cerca de 5.

5. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que o anticorpo é um fragmento de anticorpo.

6. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

7. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que o anticorpo se liga a um antígeno de célula cancerígena que está sobre a superfície de uma célula cancerígena.

8. Uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, e um portador ou veículo farmacêuticamente aceitável.

9. Uma composição para o tratamento de cancro que compreende uma quantidade do conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, sendo a dita quantidade eficaz para tratar cancro.

10. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, para utilização num método de tratamento de cancro.

11. Um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com a reivindicação 10 para utilização no tratamento de cancro, que compreende ainda o tratamento com um agente anticancerígeno adicional.

Lisboa, 30 de Março de 2015

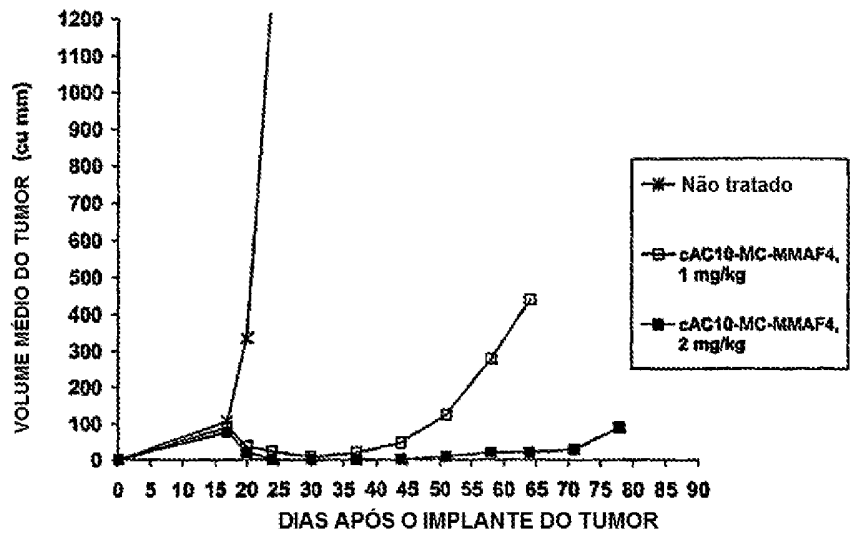


FIGURA 1

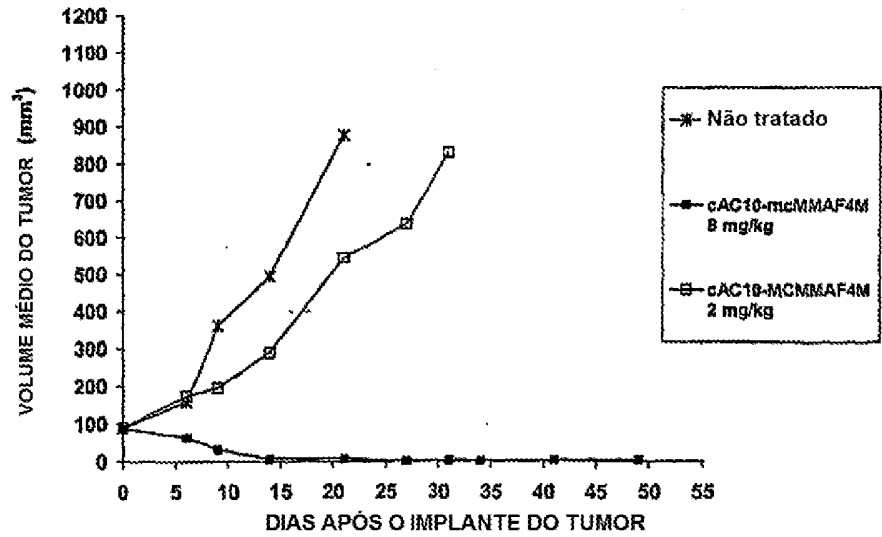


FIGURA 2

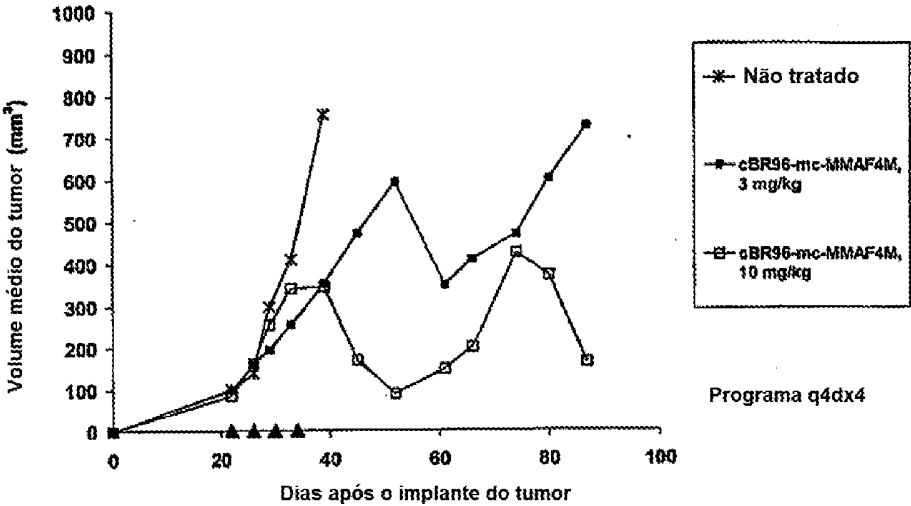


FIGURA 3a

Eficácia de Mab-mc-MMAF em carcinoma de pulmão L2987

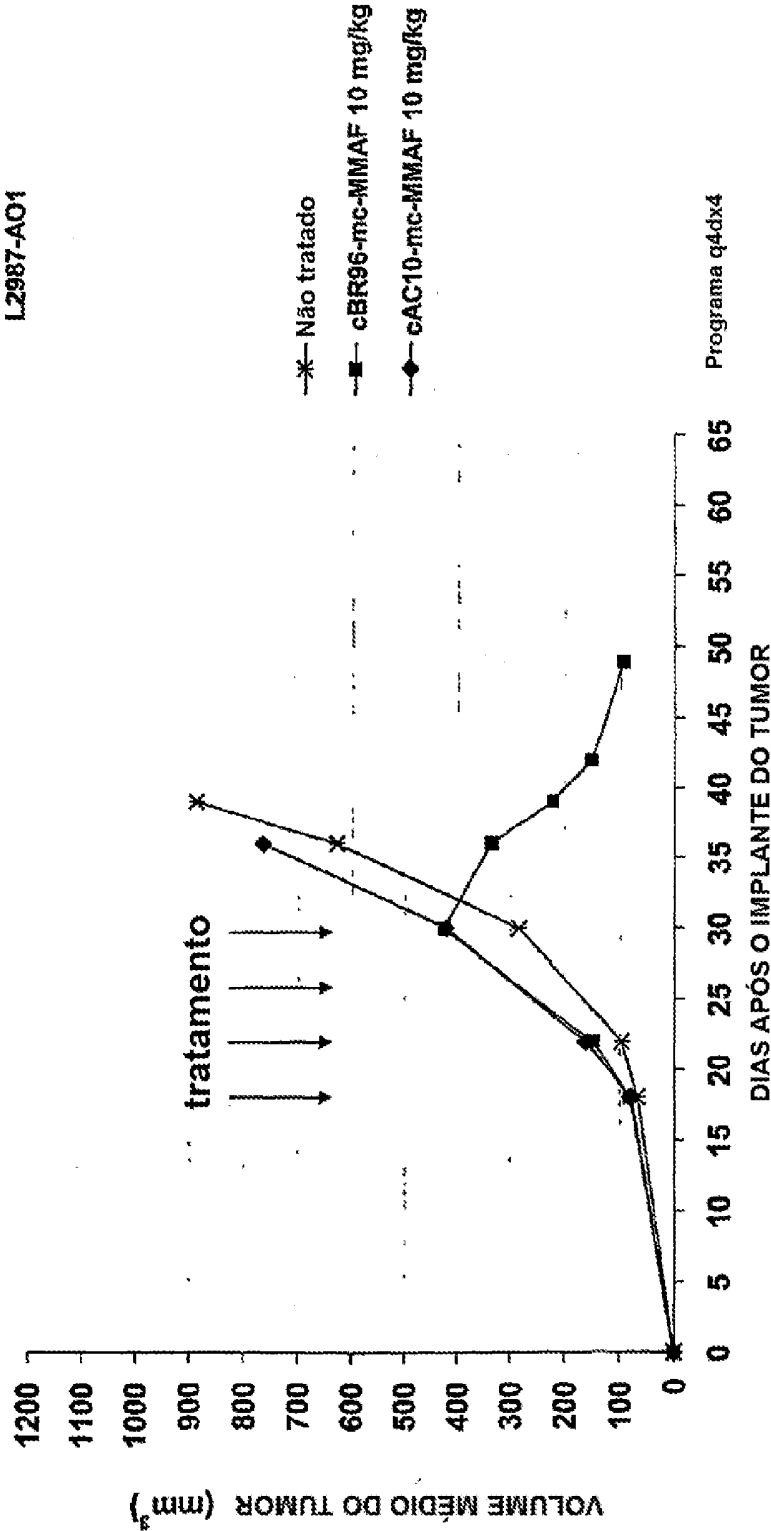


Figura 3b

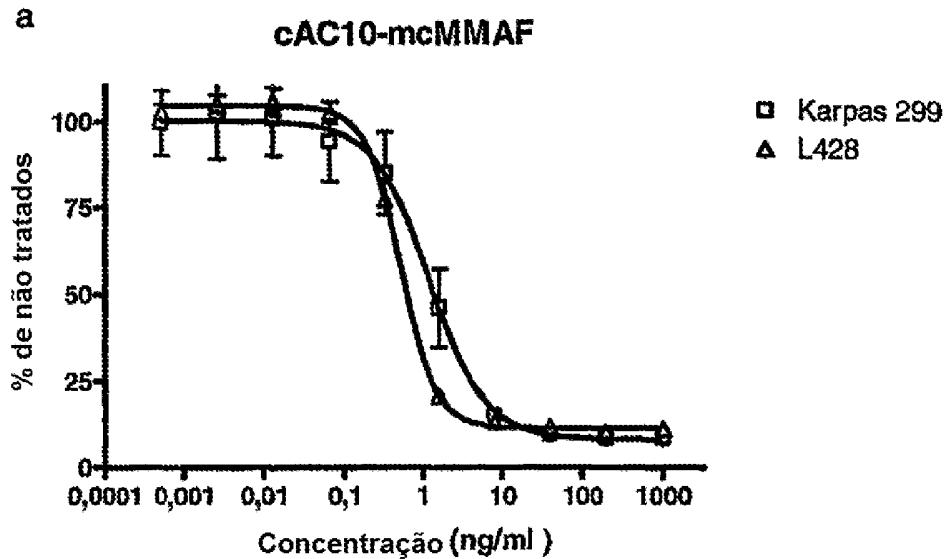


FIGURA 4a

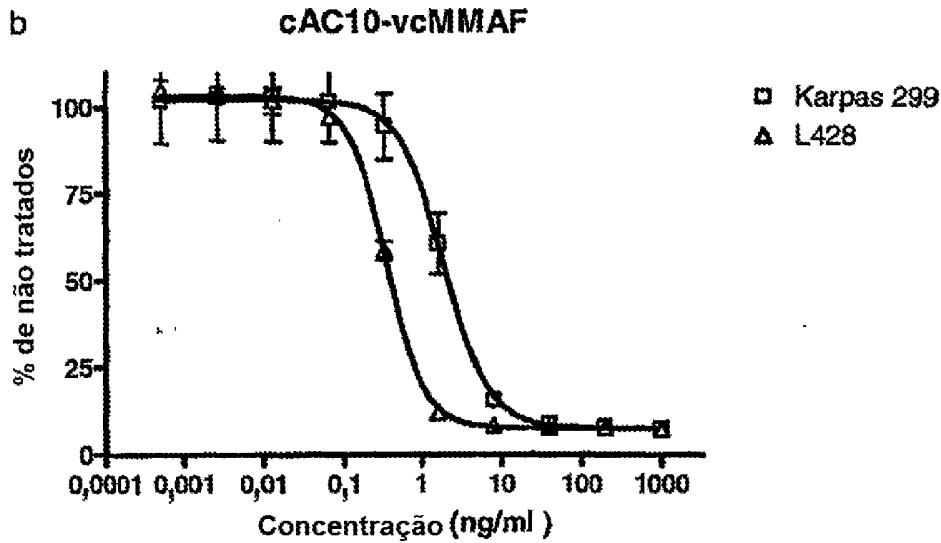


FIGURA 4b

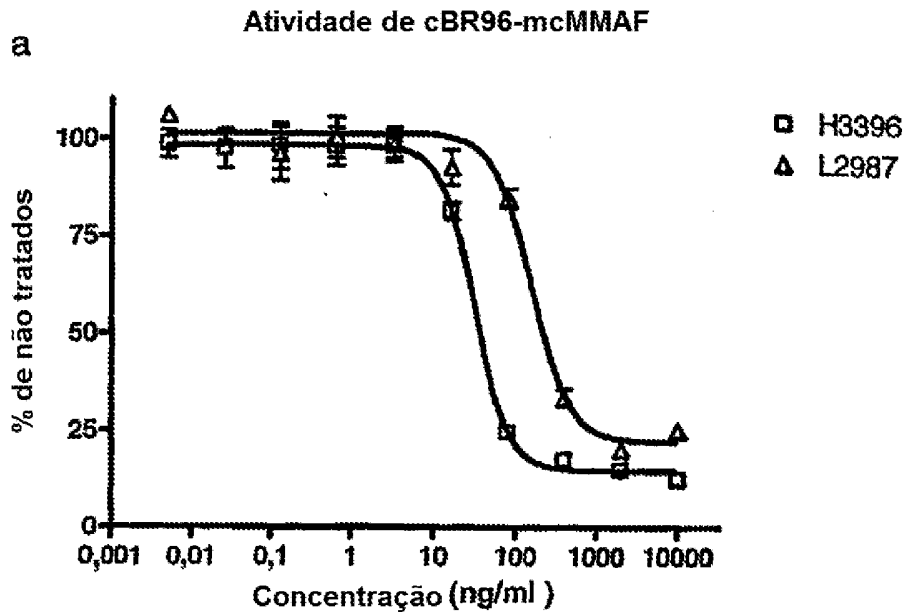


FIGURA 5a

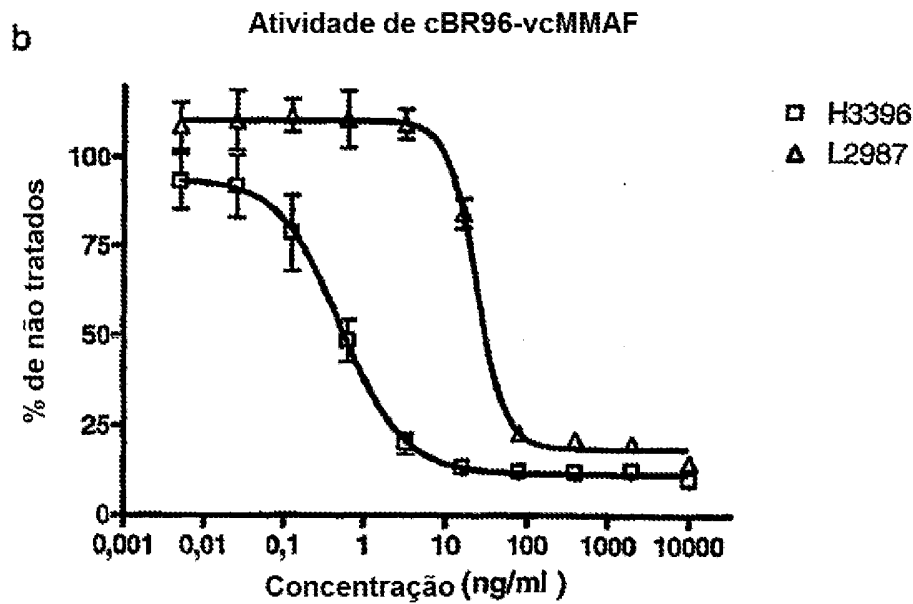


FIGURA 5b

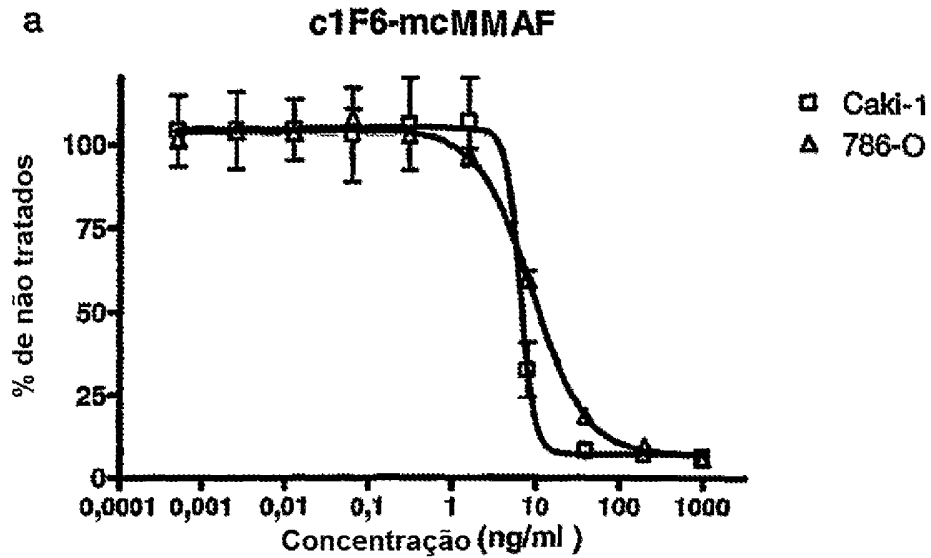


FIGURA 6a

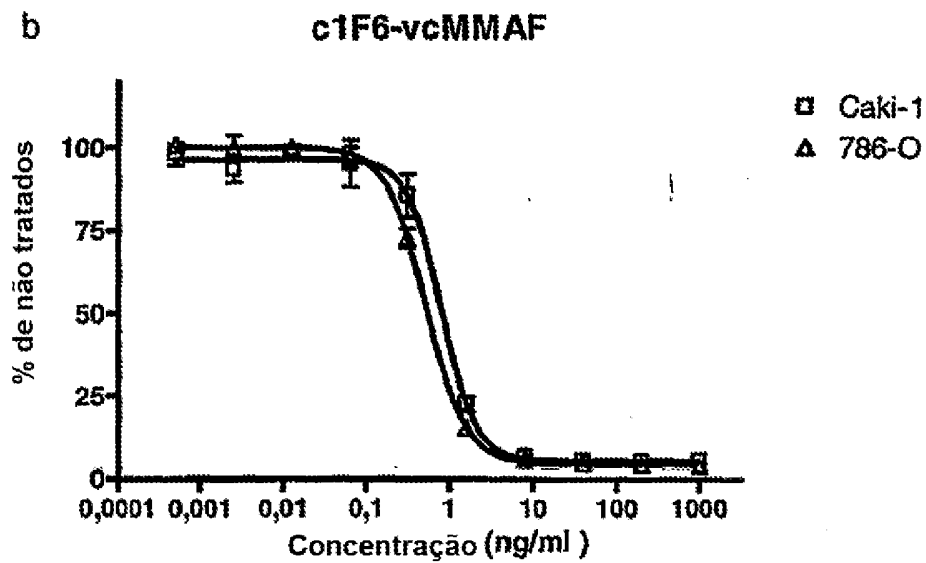


FIGURA 6b

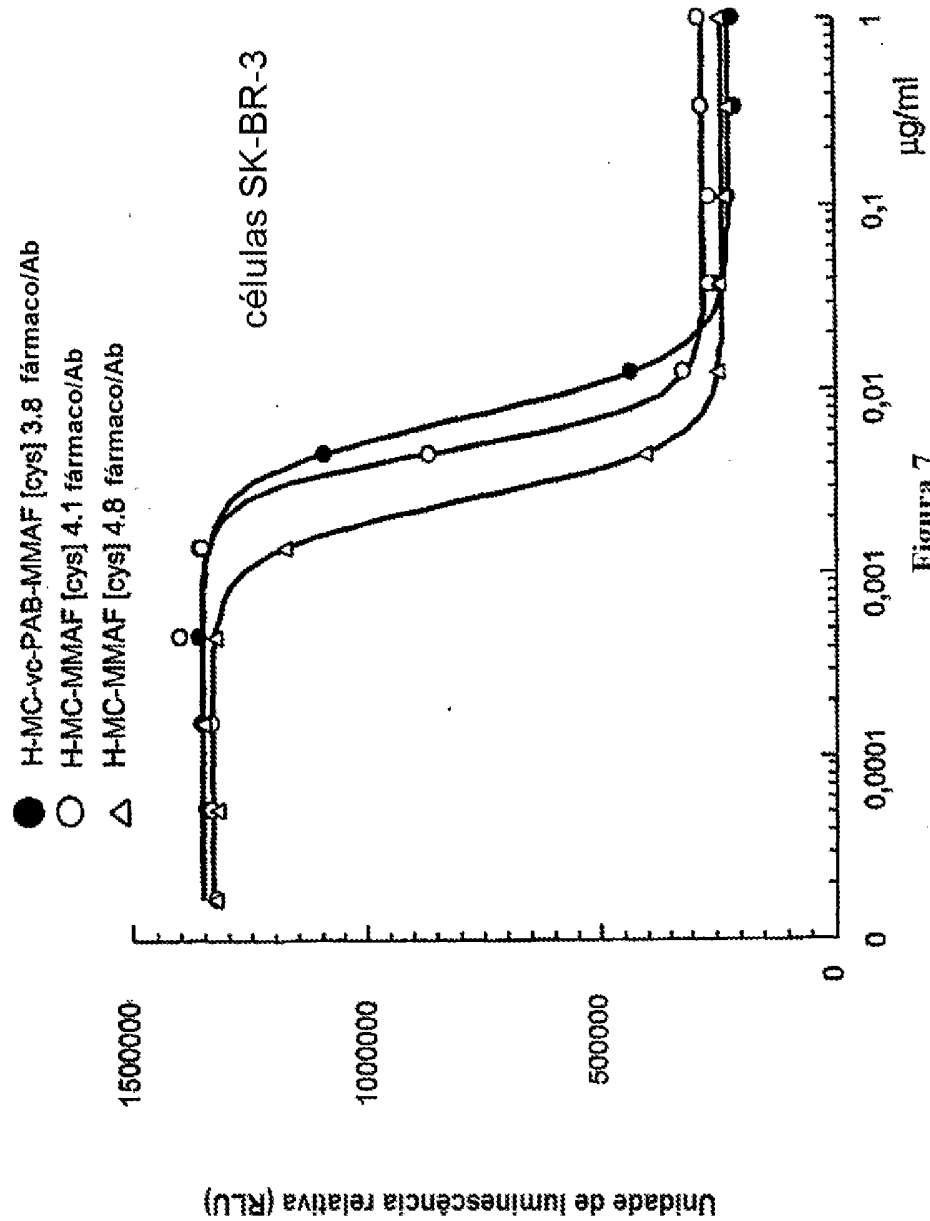
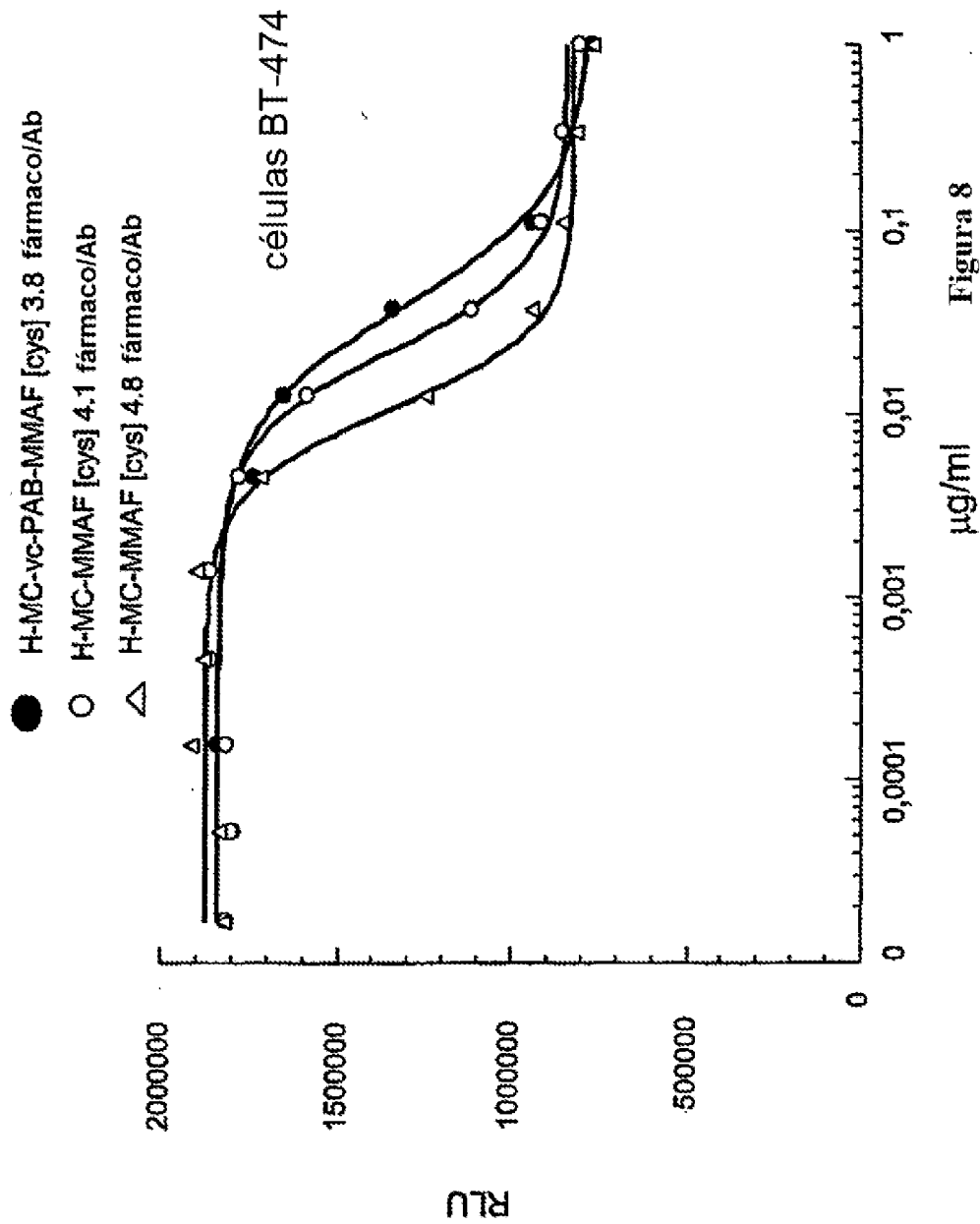


Figura 7



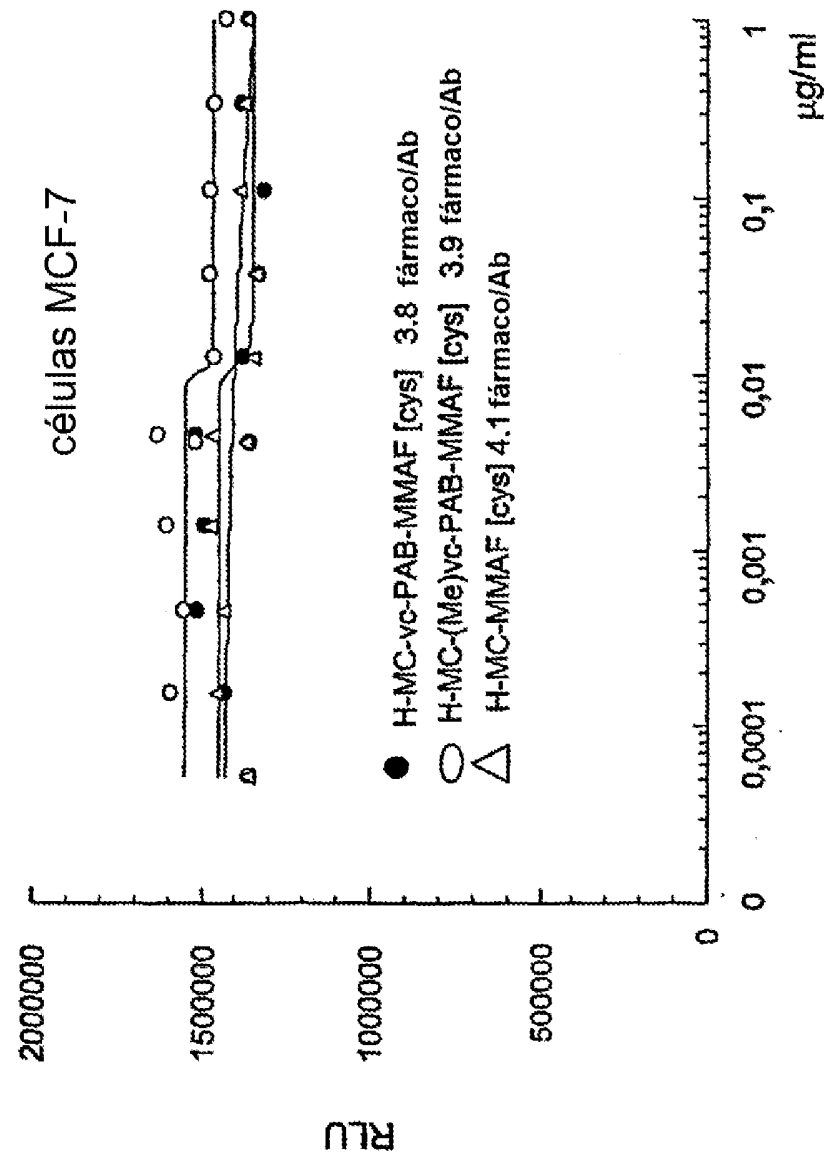


Figura 9

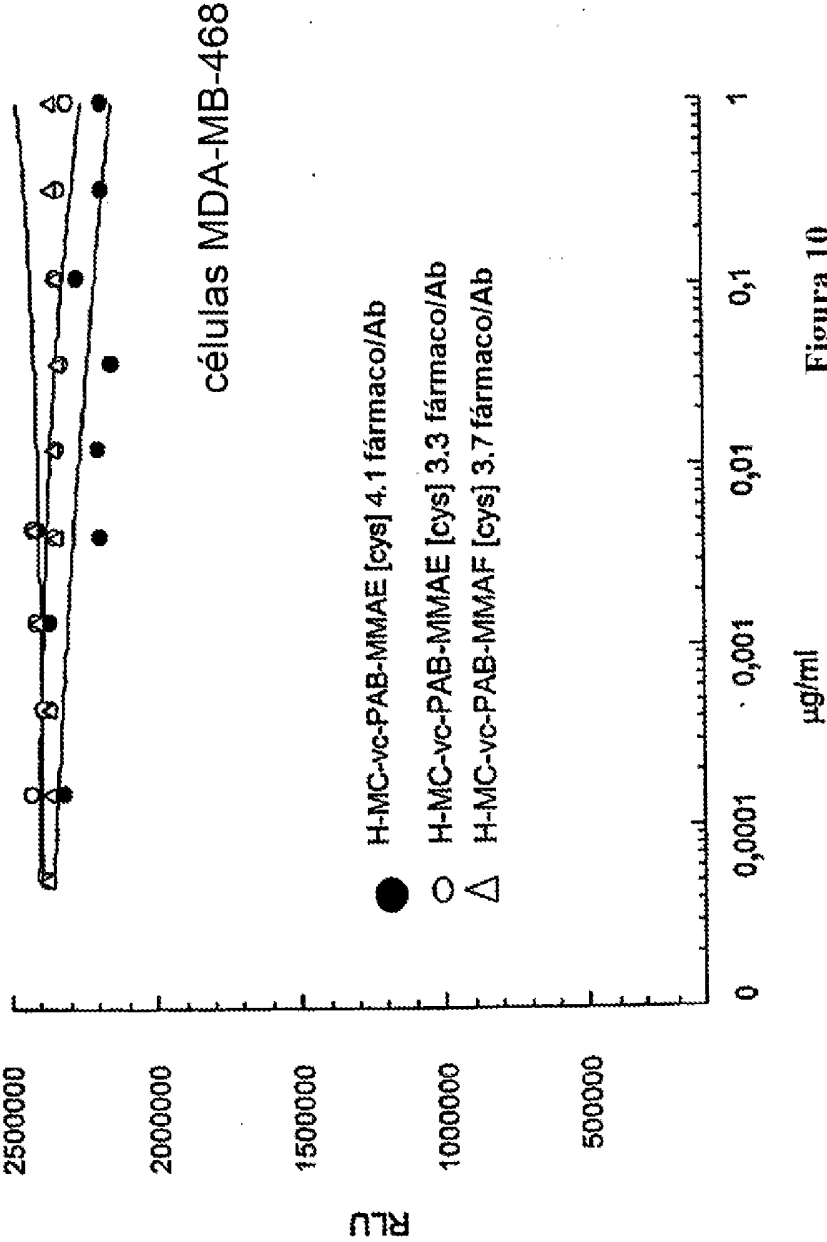


Figura 10

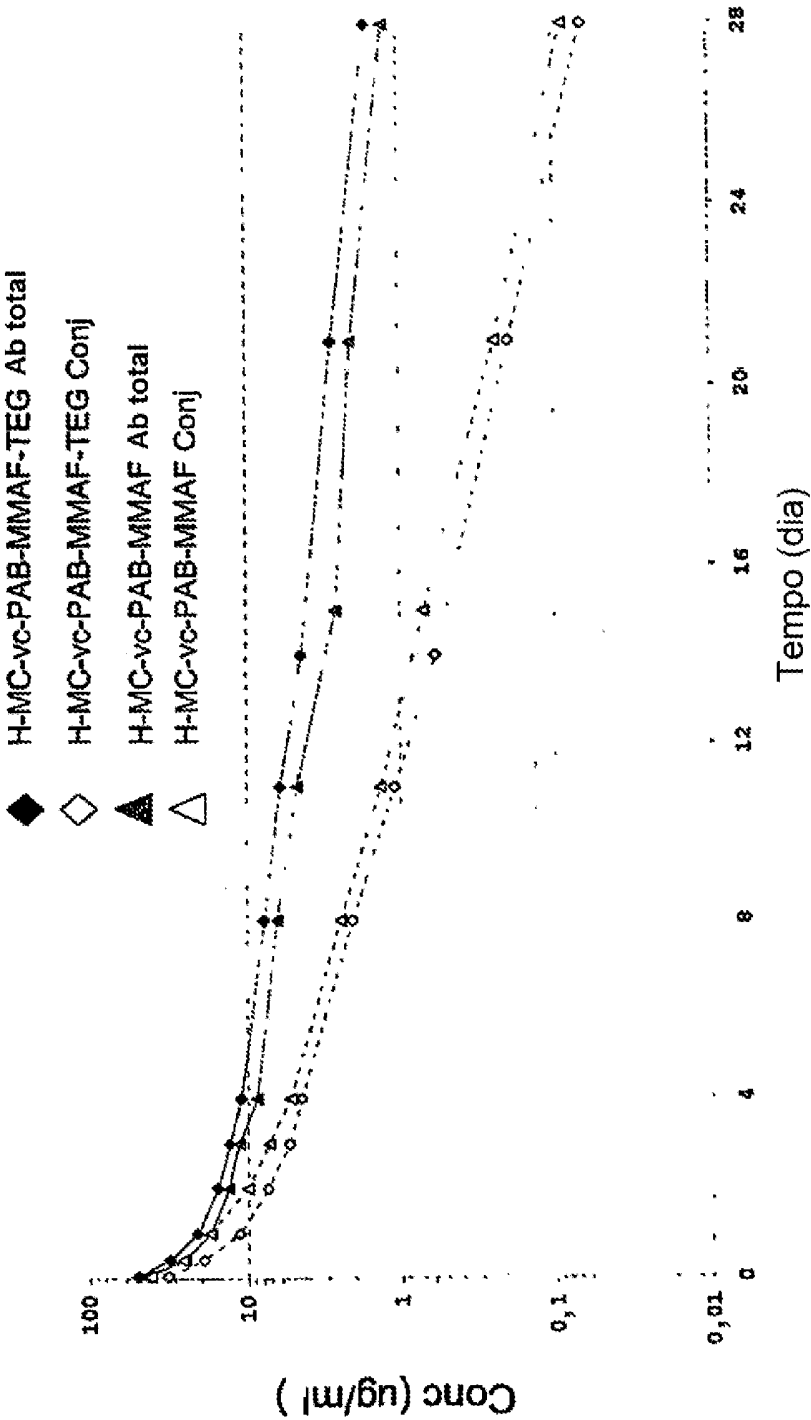


Figura 11

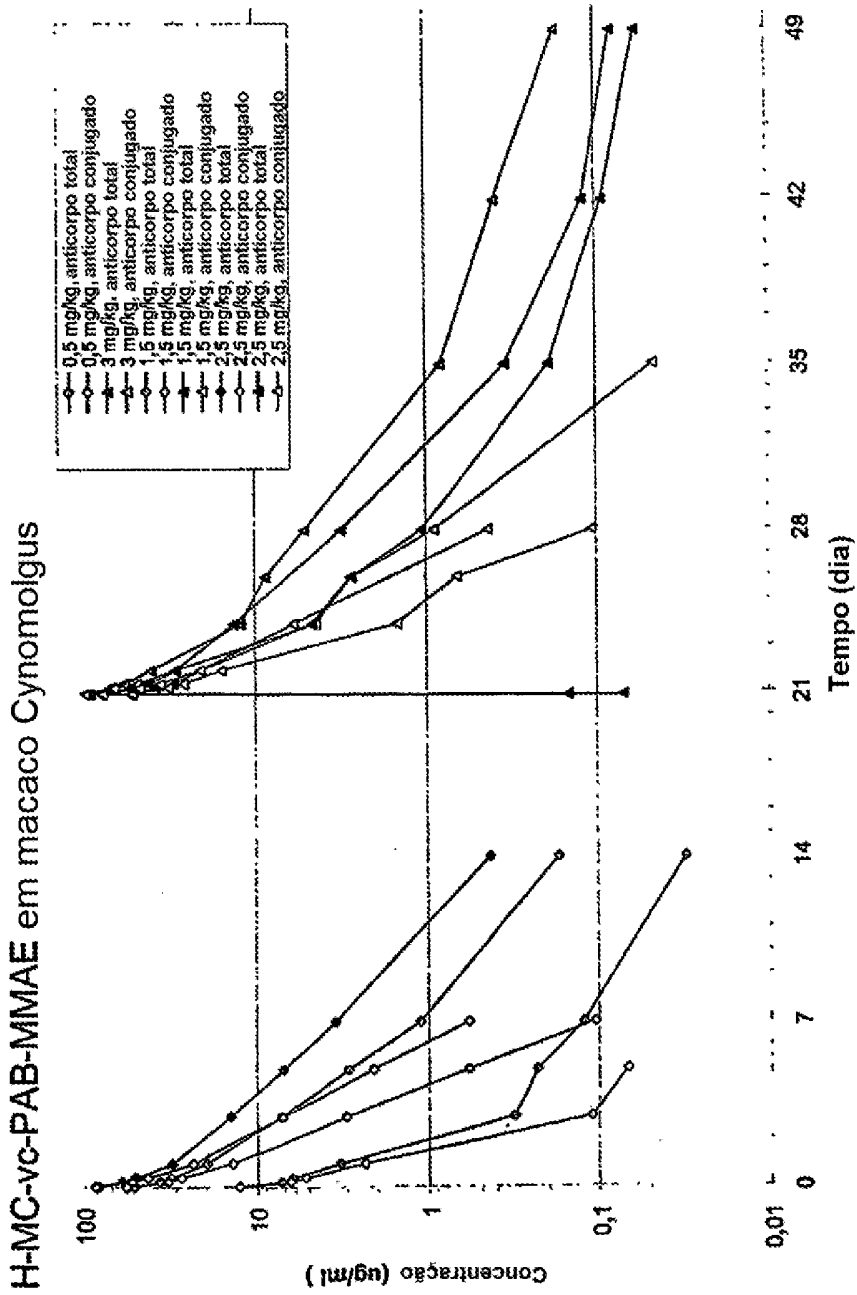


Figura 12

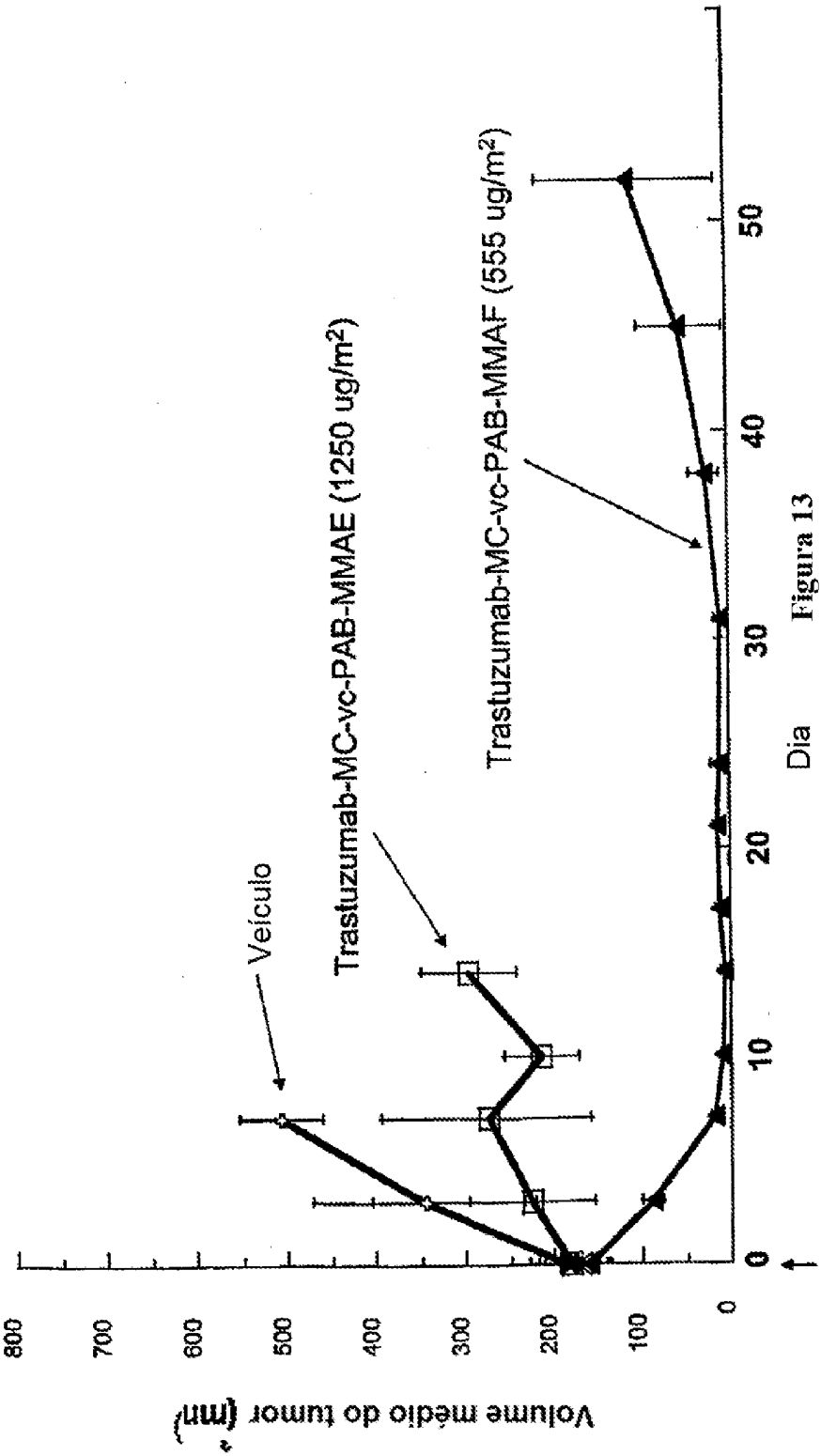


Figura 13

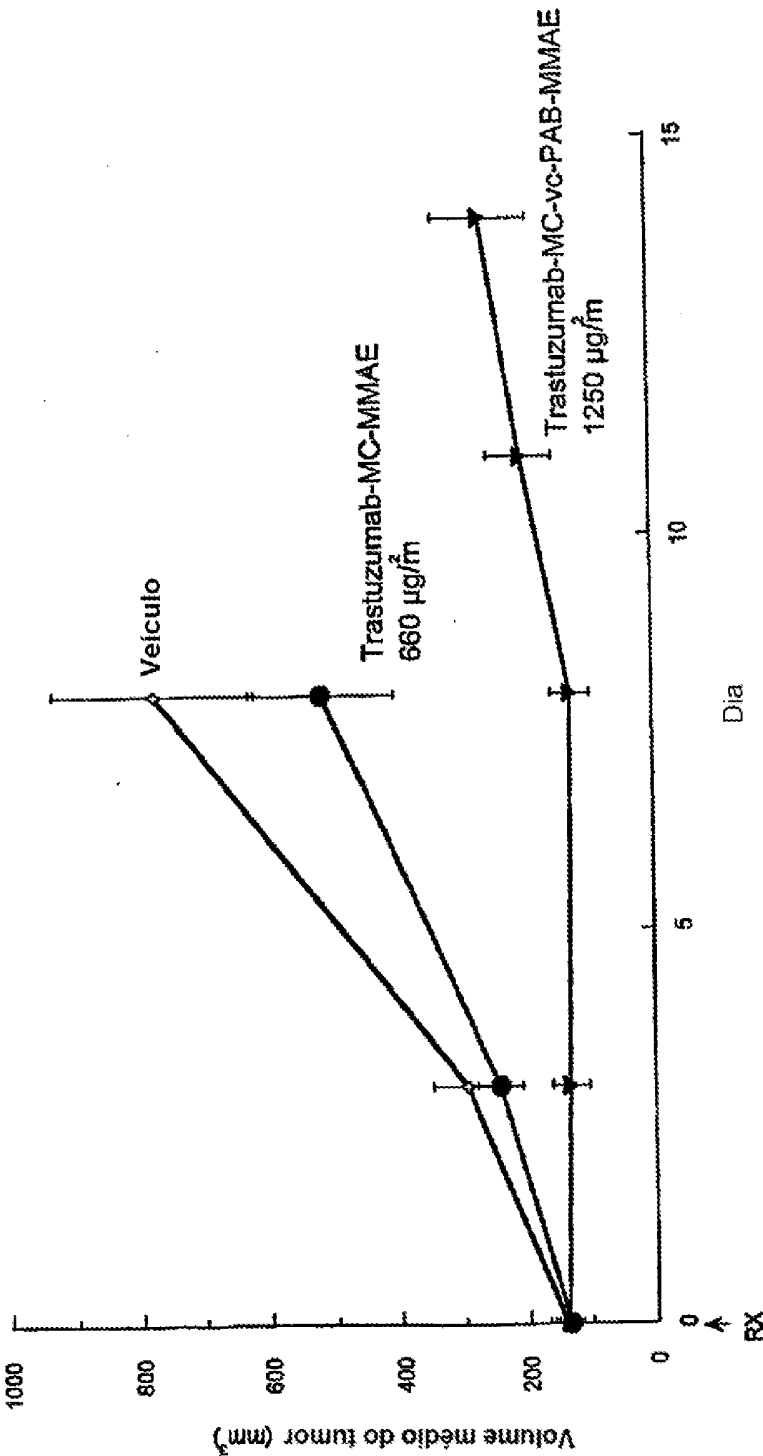


Figura 14

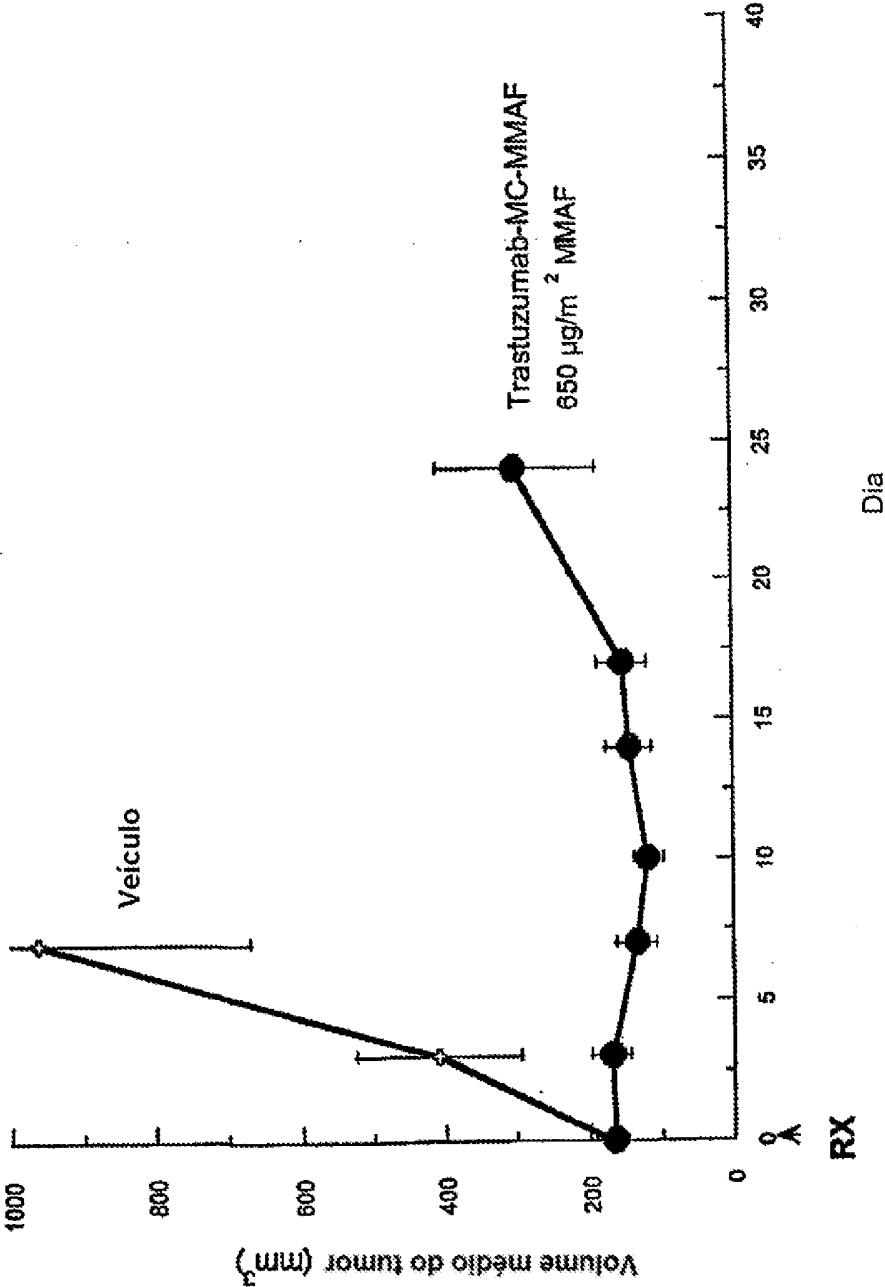
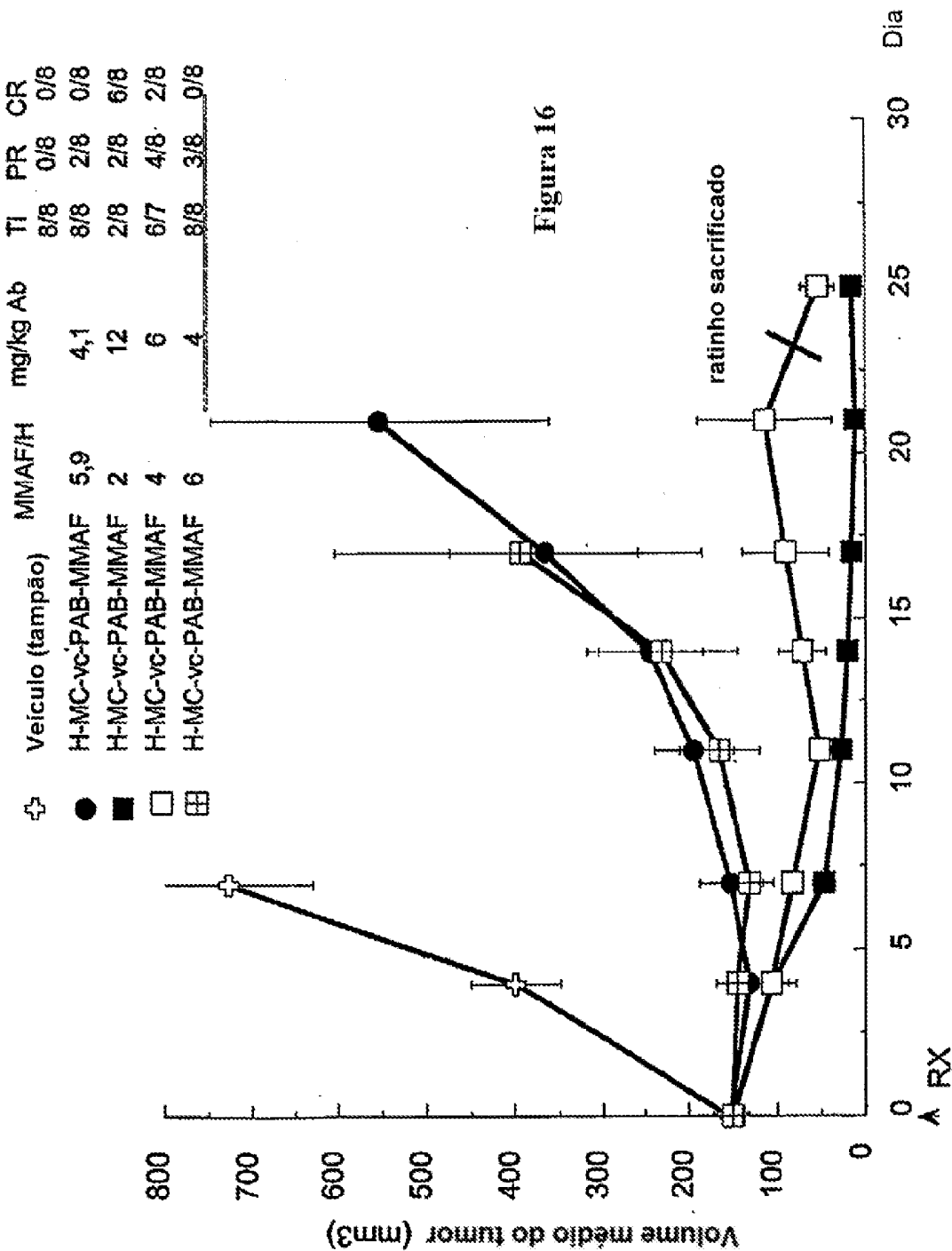


Figura 15



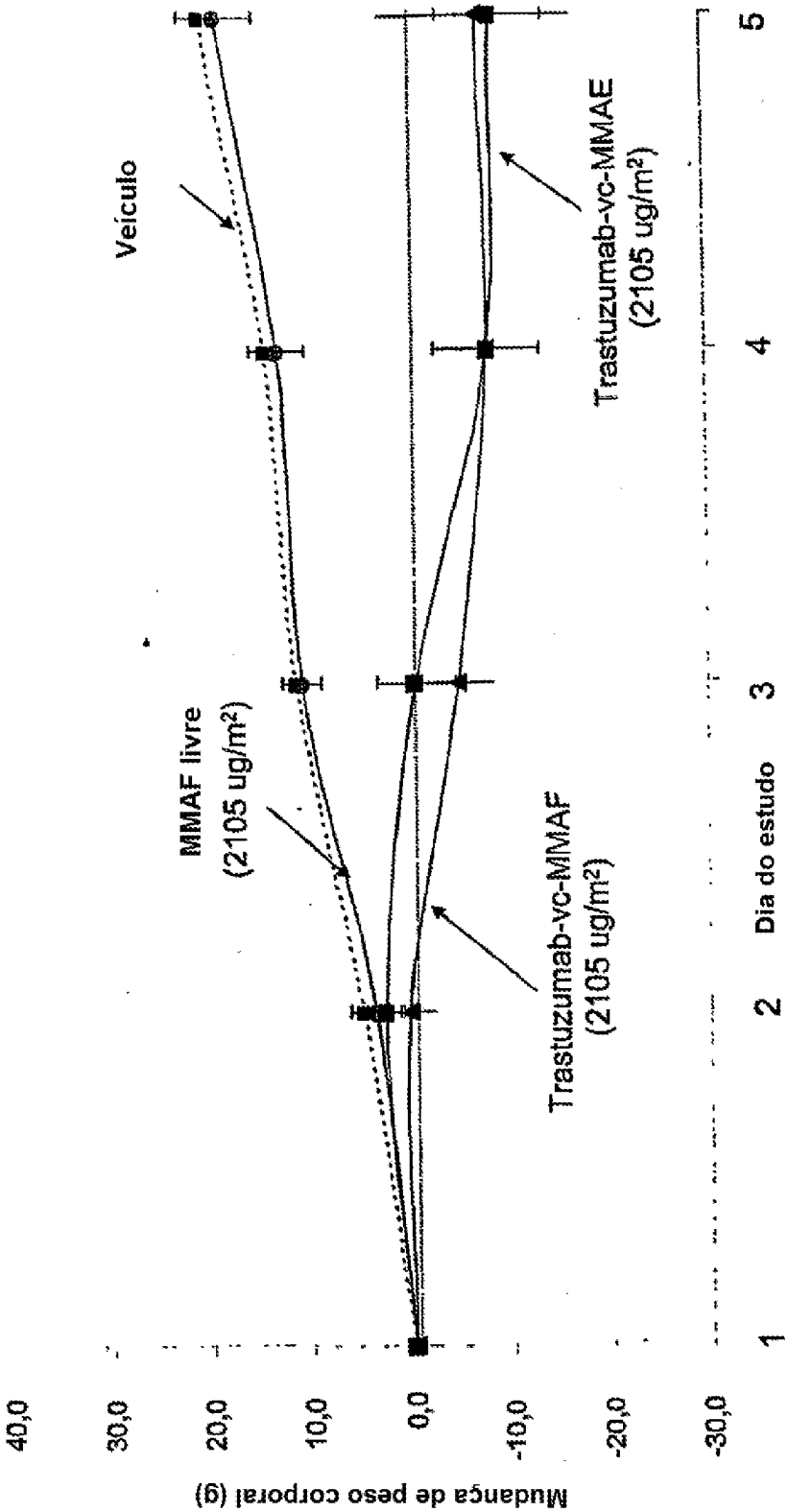


Figura 17

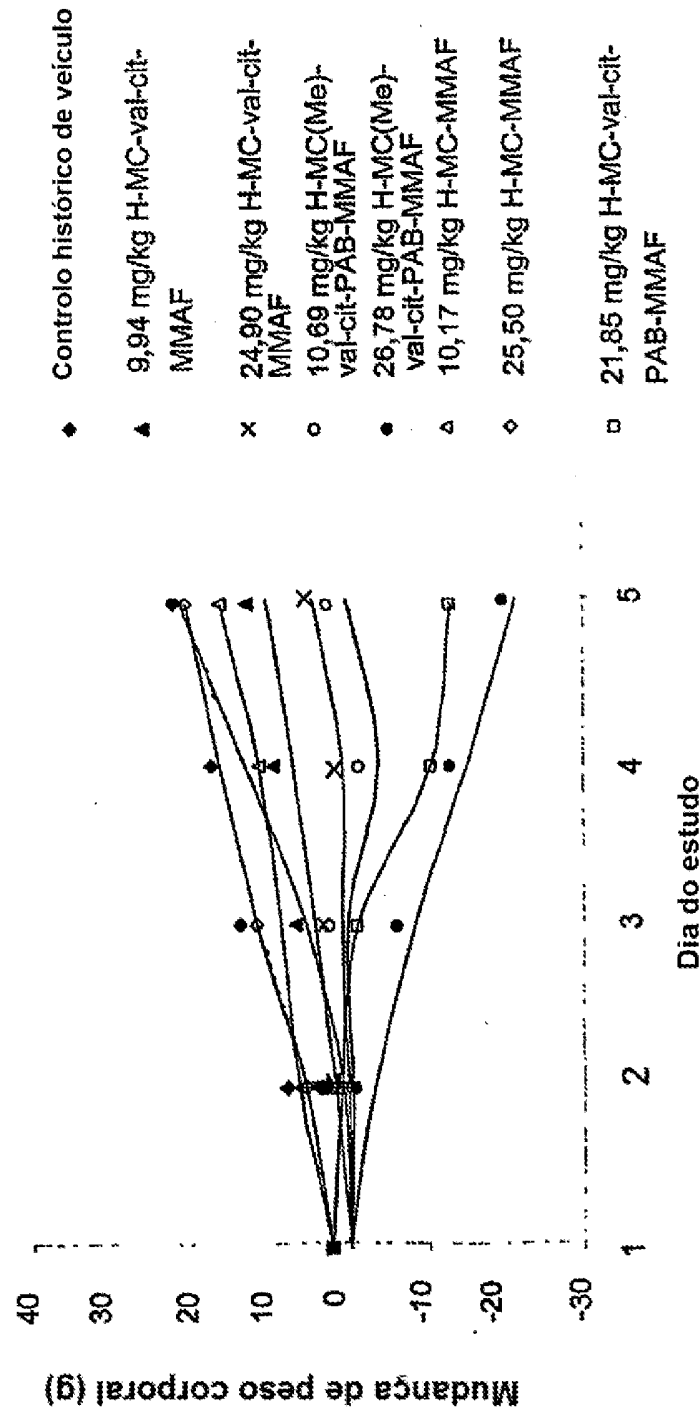


Figura 18

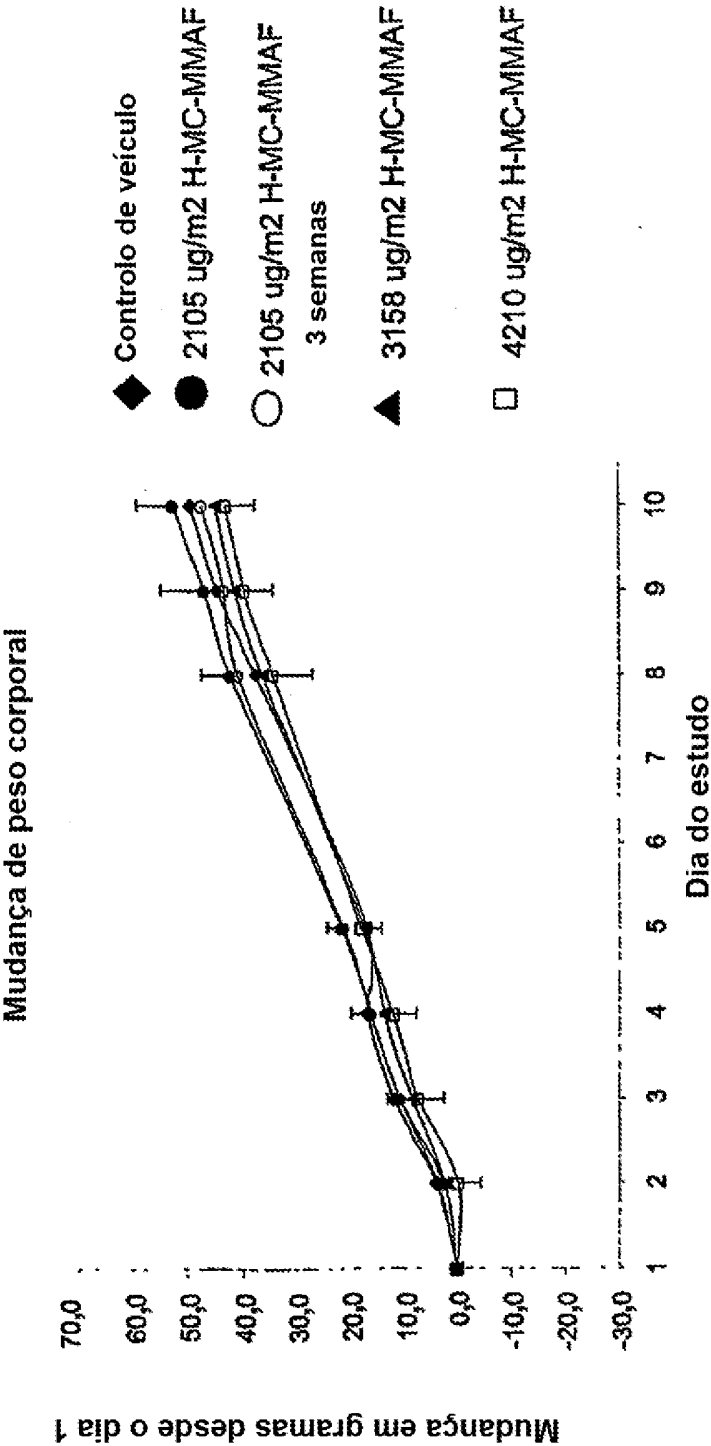


Figura 19