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

(21) BR 112020025346-4 A2

(22) Data do Depósito: 25/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 25/05/2021

(54) Título: IMUNOCONJUGADOS QUE ALVEJAM ADAM9 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 35/00; C07K 16/40; A61K 47/68; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/02/2019 US 62/810,703; 26/06/2018 US 62/690,052; 28/06/2018 US 62/691,342.

(71) Depositante(es): IMMUNOGEN, INC.; MACROGENICS, INC..

(72) Inventor(es): STUART WILLIAM HICKS; NICHOLAS C. YODER; BHASWATI BARAT; EZIO BONVINI; GUNDO DIEDRICH; LESLIE S. JOHNSON (FALECIDA); DERYK LOO; JUNIPER A. SCRIBNER.

(86) Pedido PCT: PCT US2019038992 de 25/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/005945 de 02/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 11/12/2020

(57) Resumo: "IMUNOCONJUGADOS QUE ALVEJAM ADAM9 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS". A presente invenção refere-se a imunoconjugados que compreendem um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de se ligar especificamente a "Proteína 9 que contém Domínio Desintegrina e Metaloproteinase" ("ADAM9") conjugada com pelo menos um composto maitansinoide. A invenção refere-se particularmente a tais imunoconjugados que são de reatividade cruzada com ADAM9 humana e a ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco cynomolgus). A invenção refere-se adicionalmente a todos os tais imunoconjugados que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou a Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado de modo a exibir imunogenicidade reduzida mediante administração de tal imunoconjugado com um indivíduo recipiente. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer tais imunoconjugados, e a métodos que envolvem o uso de quaisquer tais imunoconjugados no tratamento de câncer e outras doenças e afecções.

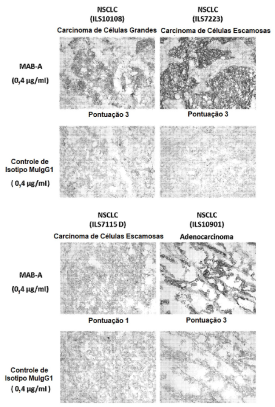


FIG. 1A

Relatório Descritivo de Patente de Invenção para **"IMUNOCONJUGADOS QUE ALVEJAM ADAM9 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS".**

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório US nº 62/690.052, depositado em 26 de junho de 2018, e do Pedido Provisório US nº 62/691.342, depositado em quinta-feira, 28 de junho de 2018, e do Pedido Provisório US nº 62/810.703, depositado em 26 de fevereiro de 2019. A totalidade destes pedidos é incorporada ao presente documento, a título de referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi apresentada eletronicamente no formato ASCII e está incorporada ao presente documento a título de referência, em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em quinta-feira, 16 de maio de 2019, é nomeada 121162-04820_SL.txt e tem 163070 bytes de tamanho.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a imunoconjugados que compreendem um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de se ligar especificamente a "Proteína 9 que contém Domínio Desintegrina e Metaloproteinase" **("ADAM9")** conjugada com pelo menos um agente farmacológico. A invenção se refere particularmente a tais imunoconjugados que são de reatividade cruzada com ADAM9 humana e a ADAM9 de um primata não humano *(*por exemplo*,* um macaco cynomolgus). A invenção se refere adicionalmente a todos os tais imunoconjugados que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado de modo a exibir imunogenicidade reduzida mediante administração de tais imunoconjugados a um indivíduo recipiente. A invenção também é direcionada a composições farma-

cêuticas que contêm quaisquer tais imunoconjugados, e a métodos que envolvem o uso de tais imunoconjugados no tratamento de câncer e outras doenças e afecções.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] ADAM é uma família de proteínas envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos (Amendola, R.S. *et al.* (2015) "ADAM9 *Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2",* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Edwars, D.R. *et al.* (2008) *"The ADAM Metalloproteases"* Molec. Aspects Med. 29:258-289). Acredita-se que pelo menos 40 membros de gene da família foram identificados, e pelo menos 21 de tais membros são funcionas em seres humanos (Li, J. *et al.* (2016) *"Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion",* J. Invest. Surg. 26(3):127-133; Duffy, M.J. *et al.* (2011) *"The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer!",* Clin. Proteomics 8:9:1-13; também consultar o Pedido de Patente US nº 2013/0045244).

[0005] Os membros de família de ADAM têm uma estrutura bem conservada com 8 domínios, entre os quais estão um domínio de metaloproteinase e um domínio de ligação a integrina (desintegrina) (Duffy, M.J. *et al.* (2009) *"The Role Of ADAMs In Disease Pathophysiology",* Clin. Chim. Acta 403:31-36). O domínio de ADAM metaloprotease atua como uma sheddase e foi relatado como modulando uma série de processos biológicos clivando-se proteínas transmembranares que, então, podem atuar como ligantes solúveis e regular a sinalização celular (Amendola, R.S. *et al.* (2015) *"ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2",* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Ito, N. *et al.* (2004) *"ADAMs, A Disintegrin And Metalloproteinases, Mediate Shedding Of Oxytocinase",* Biochem. Biophys. Res. Commun. 314 (2004)

1008-1013).

[0006] ADAM9 é um membro da família de ADAM de molécula. A mesma é sintetizada como uma forma inativa que é proteoliticamente clivada para gerar uma enzima ativa. O processamento no sítio a montante é particularmente importante para a ativação da proenzima. ADAM9 é expressada em fibroblastos (Zigrino, P. *et al.* (2011) *"The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts",* J. Biol. Chem. 286:6801-6807), células musculares lisas vasculares ativadas (Sun, C. *et al.* (2010) *"ADAM 15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERKl/2 Signalling"* Cardiovasc. Res. 87:348-355), monócitos (Namba, K. *et al.* (2001) *"Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes",* Cell. Immunol. 213:104-113), macrófagos ativados (Oksala, N. *et al.* (2009) *"ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study",* Ann. Med. 41:279-290).

[0007] A atividade de ADAM9 metaloprotease participa na degradação de componentes de matriz, para assim permitir a migração de células tumorais (Amendola, R.S. *et al.* (2015) *"ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2",* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962). Seu domínio de desintegrina, que é homólogo a muitas desintegrinas de veneno de cobra, permite a interação entre ADAM9 e integrinas, e possibilita que ADAM9 module, positivamente ou negativamente, eventos de adesão de célula (Zigrino, P. *et al.* (2011) *"The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts",* J. Biol. Chem. 286:6801-6807; Karadag, A. *et al.* (2006) *"ADAM-9 (MDC- 9/Meltringamma), A Member Of The A Disintegrin And Metalloproteinase Family, Regulates*

Myeloma-Cell-Induced Interleukin-6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha(v)Beta5 Integrin", Blood 107:3271-3278; Cominetti, M.R. *et al.* (2009) *"Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow Conditions",* Biochimie, 91:1045- 1052). O domínio de ADAM9 desintegrina demonstrou interagir com as integrinas α6β1, α6β4, αvβ5 e α9β1.

[0008] A expressão de ADAM9 foi constatada como relevante à doença, especialmente câncer. ADAM9 foi constatada como clivando e liberando várias moléculas com funções importantes na tumorigênese e angiogênese, como TEK, KDR, EPHB4, CD40, VCAM1 e CDH5. ADAM9 é expressa por muitos tipos de células tumorais, incluindo células tumorais de cânceres de mama, cânceres de cólon, cânceres gástricos, gliomas, cânceres de fígado, cânceres de pulmão de células não pequenas, melanomas, mielomas, cânceres pancreáticos e cânceres de próstata (Yoshimasu, T. *et al.* (2004) *"Overexpression Of ADAM9 In Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Brain Metastasis",* Cancer Res. 64:4190-4196; Peduto, L. *et al.* (2005) *"Critical Function For ADAM9 In Mouse Prostate Cancer",* Cancer Res. 65:9312-9319; Zigrino, P. *et al.* (2005) *"ADAM-9 Expression And Regulation In Human Skin Melanoma And Melanoma Cell Lines",* Int. J. Cancer 116:853-859; Fritzsche, F.R. *et al.* (2008) *"ADAM9 Is Highly Expressed In Renal Cell Cancer And Is Associated With Tumour Progression",* BMC Cancer 8:179:1-9; Fry, J.L. *et al.* (2010) *"Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration",* Cancer Res. 70, 8187-8198; Chang, L. *et al.* (2016) *"Combined Rnai Targeting Human Stat3 And ADAM9 As Gene Therapy For Non -Small Cell Lung Cancer",* Oncology Letters 11:1242- 1250; Fan, X. *et al.* (2016) *"ADAM9 Expression Is Associate com Glioma Tumor Grade e Histological Type, e Acts as a Prognostic*

Factor in Lower-Grade Gliomas", Int. J. Mol. Sci. 17:1276:1-11).

[0009] De modo significativo, a expressão de ADAM9 aumentada foi constatada como relacionando se positivamente com a malignidade de tumor e potencial metastático (Amendola, R.S. *et al.* (2015) *"ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2",* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Fan, X. *et al.* (2016) *"ADAM9 Expression Is Associate com Glioma Tumor Grade e Histological Type, e Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas",* Int. J. Mol. Sci. 17:1276:1-11; Li, J. *et al.* (2016) "*Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion",* J. Invest. Surg. 26(3): 127-133). Adicionalmente, ADAM9 e sua isoforma solúvel secretada parecem ser cruciais para que as células de câncer se disseminem (Amendola, R.S. *et al.* (2015) *"ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2",* J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Fry, J.L. *et al.* (2010) *"Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration",* Cancer Res. 70, 8187-8198; Mazzocca, A. (2005) "A *Secreted Form Of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion Through Tumor-Stromal Interactions",* Cancer Res. 65:4728-4738; também consultar as Patentes US nº 9.150.656; 7.585.634; 7.829.277; 8.101.361; e 8.445.198 e a Publicação de Patente US nº 2009/0023149).

[0010] Deste modo, vários estudos identificaram ADAM9 como um alvo potencial para terapia anticâncer (Peduto, L. (2009) *"ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer",* Curr. Pharm. Des. 15:2282-2287; Duffy, M.J. *et al.* (2009) *"Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression",* Clin. Cancer Res. 15:1140-1144; Duffy, M.J. *et al.* (2011) *"The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?",* Clin. Proteomics 8:9:1-13; Josson, S. *et al.* (2011) *"Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic*

Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy", Prostate 71(3):232-240; também consultar as Publicações de Patente US nº 2016/0138113, 2016/0068909, 2016/0024582, 2015/0368352, 2015/ 0337356, 2015/0337048, 2015/0010575, 2014/0342946, 2012/ 0077694, 2011/0151536, 2011/0129450, 2010/0291063, 2010/ 0233079, 2010/0112713, 2009/0285840, 2009/0203051, 2004/ 0092466, 2003/0091568 e 2002/0068062, e Publicações PCT nº WO 2016/077505, WO 2014/205293, WO 2014/186364, WO 2014/124326, WO 2014/108480, WO 2013/119960, WO 2013/098797, WO 2013/ 049704 e WO 2011/100362). Adicionalmente, a expressão de ADAM9 também foi constatada como relevante à doença pulmonar e inflamação (consultar, por exemplo, Publicações de Patente US nº 2016/0068909; 2012/0149595; 2009/0233300; 2006/0270618; e 2009/0142301). Anticorpos que se ligam à ADAM9 estão comercialmente disponíveis junto à Abeam, Thermofisher, Sigma-Aldrich e outras companhias.

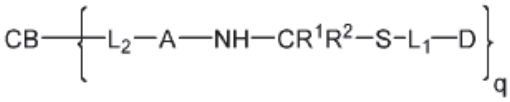
[0011] Entretanto, apesar de todos os avanços, uma necessidade existe para imunoconjugados de alvejamento de ADAM9 de alta afinidade que exibem ligação mínima a tecidos normais e são capazes de se ligar a ADAM9 humana e não humana com alta afinidade similar. A presente invenção aborda esta necessidade e a necessidade por produtos terapêuticos melhorados para câncer.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] A presente invenção se refere a imunoconjugados que compreendem um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de se ligar especificamente a "Proteína 9 que contém Domínio Desintegrina e Metaloproteinase" **("ADAM9")** conjugada com pelo menos um maitansinoide descrito no presente documento. A invenção se refere particularmente a tais imunoconjugados que são de reatividade cruzada com ADAM9 humana e a ADAM9 de um primata não humano *(*por exem-

plo, um macaco cynomolgus). A invenção se refere adicionalmente a todos os tais imunoconjugados que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado de modo a exibir imunogenicidade reduzida mediante administração de tais imunoconjugados a um indivíduo recipiente. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer tais imunoconjugados, e a métodos que envolvem o uso de tais imunoconjugados no tratamento de câncer e outras doenças e afecções.

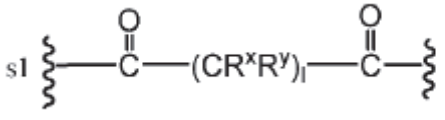
[0013] Em detalhes, a presente invenção fornece um imunoconjugado representado pela seguinte fórmula:



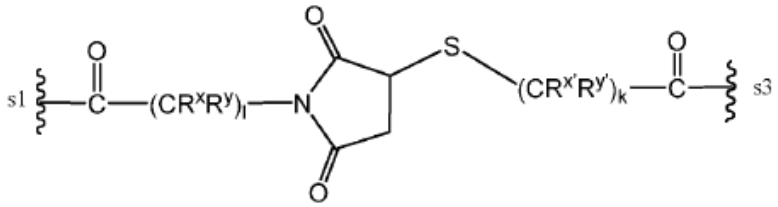
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

CB é um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo;

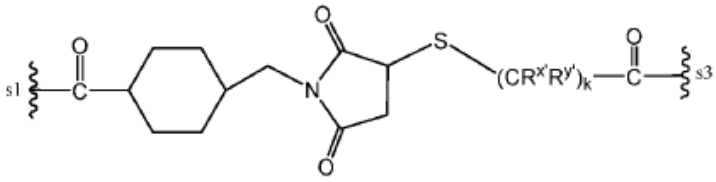
L_2 é representado por uma das seguintes fórmulas:



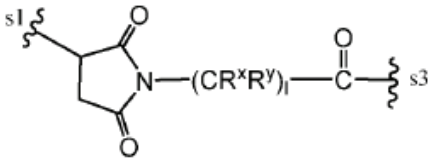
(L2a),



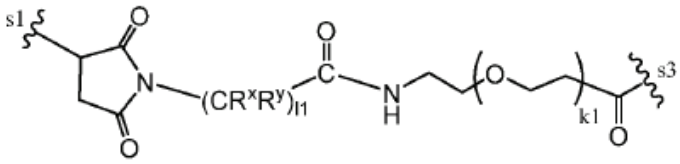
(L2b),



(L2c),



(L2d), ou



(L2e);

em que:

R^x, R^y, $R^{x'}$ e $R^{y'}$, para cada ocorrência, são, independentemente, H, -OH, halogênio, -O-(C_{1-4} alquil), -SO_3H, -$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, ou uma C_{1-4} alquila opcionalmente substituída por -OH, halogênio, SO_3H ou $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, em que R_{40}, R_{41} e R_{42} são, cada um, independentemente, H ou a C_{1-4} alquila;

I e k são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

l1 um número inteiro de 2 a 5;

k1 é um número inteiro de 1 a 5; e

s1 indica o sítio conectado ao agente de ligação de célula CB e s3 indica o sítio conectado ao grupo A;

A é um resíduo de aminoácido ou um peptídeo que compreende 2 a 20 resíduos de aminoácido;

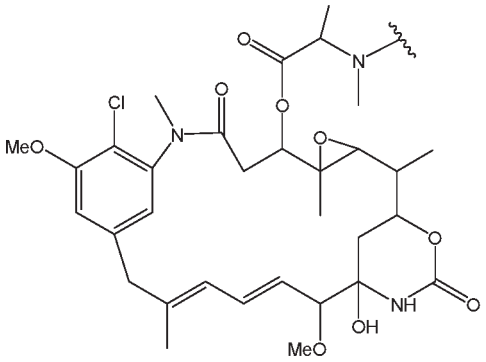
R^1 e R^2 são, cada um, independentemente, H ou a C_{1-3}alquila;

L_1 é representado pela seguinte fórmula:

$-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$

em que R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me, e a porção química -C(=O)- em Li é conectada a D;

D é representado pela seguinte fórmula:



;

q é um número inteiro de 1 a 20.

[0014] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH), em que o Domínio Variável de Cadeia Pesada compreende um Domínio de CDR_H1, um Domínio de CDR_H2 e a Domínio de CDR_H3, e o Domínio Variável de Cadeia Leve compreende um Domínio de CDR_L1, a Domínio de CDR_L2 e um Domínio de CDR_L3, em que:

(A) o dito Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e o dito Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2, e Domínio de CDR_L3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2, e Domínio de CDR_L3 do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de MAB-A; ou

(B) o dito Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de MAB-A; e o dito Domínio de CDR_L1, Domí-

nio de CDR_L2, e Domínio de CDR_L3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2 e Domínio de CDR_L3 de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de MAB-A; ou

(C) o dito Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e o dito Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2, e Domínio de CDR_L3 têm a sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2, e Domínio de CDR_L3 de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de MAB-A

[0015] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende:

(A) (1) o Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de MAB-A; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(B) (1) o Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2 e Domínio de CDR_L3 do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) MAB-A; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 de um Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(C) (1) o Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 de um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante otimizada de MAB-A; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(D) (1) o Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2 e Domínio de CDR_L3 de um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de uma variante otimizada de MAB-A; e

(2) a FR1, FR2, FR3 e FR4 do Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(E) (1) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A; e

(2) o Domínio Variável de Cadeia Leve VL (VL) de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A.

[0016] Em certas modalidades, o Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3 do Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) da variante otimizada de MAB-A tem respectivamente as sequências de aminoácidos de:

(1) SEQ ID NO:47 ($SYWX_1H$)

em que: X_1 é M ou I;

(2) SEQ ID NO:48 ($EIIPIX_2GHTNYNEX_3FX_4X_5$)

em que: X_2, X_3, X_4 e X_5 são independentemente selecionados, e

em que: X_2 é N ou F; X_3 é K ou R;

X_4 é K ou Q; e

X_5 é S ou G; e

(3) SEQ ID NO:49 ($GGYYYYYX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}DY$)

em que: X_6 é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D, e X_7, X_8, X_9, X_{10} e X_{11} são selecionados de modo que:

(A) quando $\boldsymbol{X_6}$ é P:

X_7 seja K ou R; X_8 seja F ou M; X_9 seja G;

X_{10} seja W ou F; e X_{11} seja M, L ou K;

(B) quando $\mathbf{X_6}$ é F, Y ou W:

X_7 seja N ou H; X_8 seja S ou K; X_9 seja G ou A;

X_{10} seja T ou V; e X_{11} seja M, L ou K;

(C) quando $\mathbf{X_6}$ é I, L ou V:

X_7 seja G; X_8 seja K; X_9 seja G ou A;

X_{10} seja V; e X_{11} seja M, L ou K;

(D) quando **X_6** é T:

X_7 seja G; X_8 seja K, M ou N; X_9 seja G;

X_{10} seja V ou T; e X_{11} seja L ou M;

(E) quando **X_6** é G:

X_7 seja G; X_8 seja S; X_9 seja G;

X_{10} seja V; e X_{11} seja L; e

(F) quando **X_6** é D:

X_7 seja S; X_8 seja N; X_9 seja A;

X_{10} seja V; e X_{11} seja L.

[0017] Em certas modalidades, o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) da variante otimizada de MAB-A compreende a sequência de aminoácidos da **SEQ ID NO:15:**

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWX$_1$H**WVRQA
PGKGLEWVG**E** **IIPIX$_2$GHTNY** **NEX$_3$FX$_4$X$_5$**RFTI SLDNSKNTLY
LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG** **YYYYX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$**
DYWGQGTTVT VSS

em que: X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, e X_6 são independentemente selecionados, em que: X_1 é M ou I; X_2 é N ou F;

X_3 é K ou R; X_4 é K ou Q;

X_5 é S ou G, e X_6 é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D;

em que: X_7, X_8, X_9, X_{10} e X_{11} são selecionados de modo que:

quando X_6 é P; X_7 seja K ou R; X_8 seja F ou M; X_9 seja G; X_{10} seja W ou F; e X_{11} seja

M, L ou K;

quando X_6 é F, Y ou W; X_7 seja N ou H; X_8 seja S ou K; X_9 seja G ou A; X_{10} seja T ou V; e X_{11} seja M, L ou K;

quando X_6 é I, L ou V; X_7 seja G; X_8 seja K; X_9 seja G ou A; X_{10} seja V; e X_{11} seja M, L ou K;

quando X_6 é T; X_7 seja G; X_8 seja K, M ou N; X_9 seja G; X_{10} seja V ou T; e X_{11} seja L ou M;

quando X_6 é G; X_7 seja G; X_8 seja S; X_9 seja G; X_{10} seja V; e X_{11} seja L;

quando X_6 é D; X_7 seja S; X_8 seja N; X_9 seja A; X_{10} seja V; e X_{11} seja L.

[0018] Em certas modalidades, o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) da variante otimizada de MAB-A é selecionado do grupo que consiste em:

(1) hMAB-A VH(1) **(SEQ ID NO:16);**

(2) hMAB-A VH(2) **(SEQ ID NO:17);**

(3) hMAB-A VH(3) **(SEQ ID NO:18);**

(4) hMAB-A VH(4) **(SEQ ID NO:19);**

(5) hMAB-A VH(2A) **(SEQ ID NO:20);**

(6) hMAB-A VH(2B) **(SEQ ID NO:21);**

(7) hMAB-A VH(2C) **(SEQ ID NO:22);**

(8) hMAB-A VH(2D) **(SEQ ID NO:23);**

(9) hMAB-A VH(2E) **(SEQ ID NO:24);**

(10) hMAB-A VH(2F) **(SEQ ID NO:25);**

(11) hMAB-A VH(2G) **(SEQ ID NO:26);**

(12) hMAB-A VH(2H) **(SEQ ID NO:27);**

(13) hMAB-A VH(2I) **(SEQ ID NO:28);** e

(14) hMAB-A VH(2J) **(SEQ ID NO:29).**

[0019] Em certas modalidades, o Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2 e Domínio de CDR_L3 do Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) da variante otimizada de MAB-A tem respectivamente as sequências de aminoácidos de:

（**1**）**SEQ ID NO:66** (X_{12}ASQSVDYX_{13}GDSYX_{14}N)

em que: X_{12}, X_{13}, X_{14} são independentemente selecionados, e

em que: X_{12} é K ou R; X_{13} é D ou S; e X_{14} é M ou L;

(2)SEQ ID NO:13 (AASDLES); e

(3)SEQ ID NO:67 (QQS$X_{15}X_{16}X_{17}$PFT)

em que: X_{15}, X_{16} e X_{17} são independentemente selecionados, e

em que: X_{15} é H ou Y; X_{16} é E ou S; e X_{17} é D ou T.

[0020] Em certas modalidades, o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) compreende a sequência de aminoácidos da **SEQ ID NO:53:**

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC**X_{12}ASQSVD**
YX$_{13}$GDSYX$_{14}$NWY	QQKPGQPPKL	LIY**AASDLES**
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC**QQSX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$PF**	**T**FGQGTKLEI	K

em que: X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16} e X_{17} são independentemente selecionados, e

em que: X_{12} é K ou R; X_{13} é D ou S;

X_{14} é M ou L; X_{15} é H ou Y;

X_{16} é E ou S; e X_{17} é D ou T.

[0021] Em certas modalidades, o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) da variante otimizada de MAB-A é selecionado do grupo que consiste em:

(1) hMAB-A VL(1) **(SEQ ID NO:54);**

(2) hMAB-A VL(2) **(SEQ ID NO:55);**

(3) hMAB-A VL(3) **(SEQ ID NO:56);**

(4) hMAB-A VL(4) **(SEQ ID NO:57);**

(5) hMAB-A VL(2A) **(SEQ ID NO:20).**

[0022] Em certas modalidades, o Domínio de CDR_H1 compreende a sequência de aminoácidos SYWMH **(SEQ ID NO:8),** o Domínio de CDR_H2 compreende a sequência de aminoácidos EIIPIFGHTNYNEKFKS **(SEQ ID NO:35),** e o Domínio de CDR_H3 compreende a sequência de aminoácidos GGYYYYPRQGFLDY **(SEQ ID NO:45)**

[0023] Em certas modalidades, o Domínio de CDR_L1 compreende a sequência de aminoácidos KASQSVDYSGDSYMN **(SEQ ID NO:62),** o Domínio de CDR_L2 compreende a sequência de aminoácidos AASDLES **(SEQ ID NO:13),** e o Domínio de CDR_L3 compreende a sequência de aminoácidos QQSHEDPFT **(SEQ ID NO:14).**

[0024] Em certas modalidades, o imunoconjugado compreende:

(A) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de hMAB-A **(2I.2) (SEQ ID NO:28);** ou

(B) o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de hMAB-A **(2I.2) (SEQ ID NO:55);** ou

(C) o Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) de hMAB-A **(2I.2) (SEQ ID NO:28)** e o Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) de hMAB-A **(2I.2) (SEQ ID NO:55)**

[0025] Em certas modalidades, o imunoconjugado compreende uma Região Fc. Em algumas modalidades, a Região Fc é uma Região Fc variante que compreende: (a) uma ou mais modificações de aminoácido que reduzem a afinidade da Região Fc variante para um FcγR; e/ou (b) uma ou mais modificações de aminoácido que introduzem um resíduo de cisteína. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações de aminoácido que reduzem a afinidade da Região Fc variante para um FcγR compreendem: (A) L234A; (B) L235A; ou (C) L234A e L235A; em que a dita numeração é aquela do índice EU, como em Kabat. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações de aminoácido que introduzem um resíduo de cisteína compreende S442C, em que a dita numeração é aquela do índice EU, como em Kabat.

[0026] Em certas modalidades, o imunoconjugado da presente invenção compreende um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que se liga especificamente à ADAM9 humana e cyno ADAM9, em que o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo é conjugado com o agente farmacológico.

[0027] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de

CDR_L3 que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 8, 36 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente; e

(d) SEQ ID NOs: 34, 36 e 10 e SEQ ID NOs: 64, 13, 65, respectivamente.

[0028] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e (d) SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

[0029] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e

(d) SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

[0030] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humani-

zado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo é otimizado para ter pelo menos uma intensificação de 100 vezes em afinidade de ligação com cyno ADAM9 e retém ligação de alta afinidade à ADAM9 humana em comparação com o anticorpo parental quimérico ou murino.

[0031] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 8, 35 e 37 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 8, 35 e 38 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 8, 35 e 39 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 8, 35 e 40 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(e) SEQ ID NOs: 8, 35 e 41 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs: 8, 35 e 42 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 8, 35 e 43 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(h) SEQ ID NOs: 8, 35 e 44 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente; e

(j) SEQ ID NOs: 8, 35 e 46 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente.

[0032] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humani-

zado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas às sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e
(j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[0033] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e
(j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[0034] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado é um anticorpo de comprimento completo que compreende uma região Fc. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc variante que compreende:

(a) uma ou mais modificações de aminoácido que reduzem a afinidade da região Fc variante para um FcγR selecionado do grupo que consiste em: L234A, L235A, e L234A e L235A; e/ou

(b) uma modificação de aminoácido que introduz um resíduo de cisteína em S442, em que a dita numeração é aquela do índice EU, como em Kabat; e/ou

(c) uma ou mais substituições de aminoácido que estendem a meia-vida da região Fc variante para FcRn selecionado do grupo que consiste em: M252Y, S254T e T256E

[0035] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:50 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(b) SEQ ID NO:51 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e

(c) SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[0036] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 141 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 142 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 143 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(d) SEQ ID NO: 151 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(e) SEQ ID NO: 152 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(f) SEQ ID NO: 153 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e

(g) SEQ ID NO: 154 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[0037] Em certas modalidades, X na SEQ ID NO: 141, SEQ ID

NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 ou SEQ ID NO: 154 é lisina.

[0038] Em certas modalidades, X na SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 ou SEQ ID NO: 154 está ausente.

[0039] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 156 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 155 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[0040] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO: 157 e uma cadeia pesada codificada pela (i) SEQ ID NO: 159, (ii) SEQ ID NO: 160, (iii) SEQ ID NO: 161 ou (iv) SEQ ID NO: 162.

[0041] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO: 158 e uma cadeia pesada codificada pela (i) SEQ ID NO: 159, (ii) SEQ ID NO: 160, (iii) SEQ ID NO: 161 ou (iv) SEQ ID NO: 162.

[0042] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO:157 e uma cadeia pesada codificada pela SEQ ID NO:161.

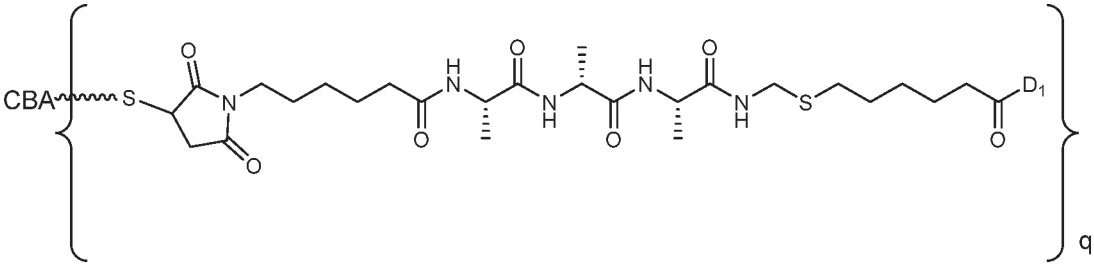
[0043] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO: 157 e uma cadeia pesada codificada pela SEQ ID NO: 162.

[0044] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO:158 e uma cadeia pesada codificada pela SEQ ID NO:161.

[0045] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia leve codificada pela SEQ ID NO: 158 e

uma cadeia pesada codificada pela SEQ ID NO: 162.

[0046] Em certas modalidades, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:

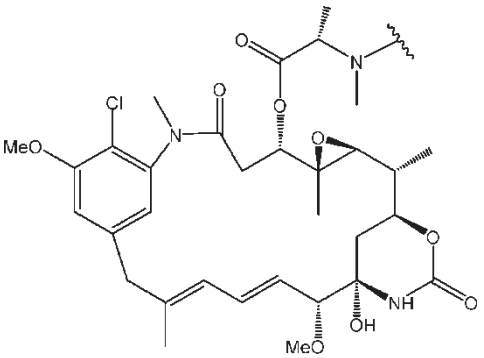


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

q é 1 ou 2;

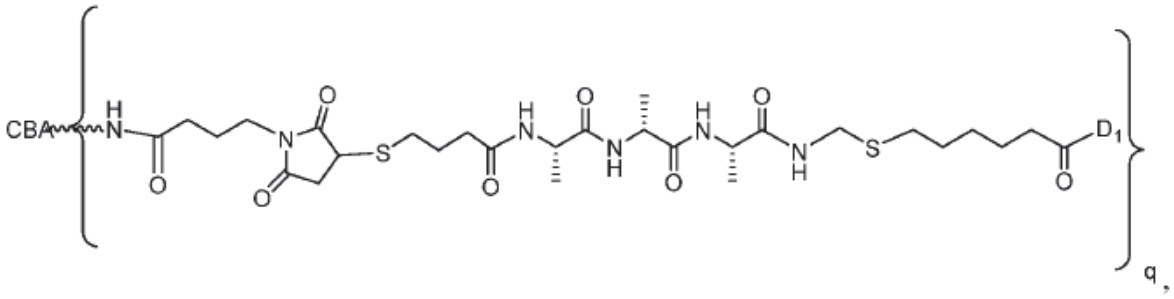
D_1 é representado pela seguinte fórmula:



[0047] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências da SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 142 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9

humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 152 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO: 142 ou SEQ ID NO: 152 é lisina. Em algumas modalidades, Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO: 142 ou SEQ ID NO: 152 está ausente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 156 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o valor de DAR para uma composição (por exemplo, composições farmacêuticas) que compreende o imunoconjugado está na faixa de 1,0 a 2,5, 1,5 a 2,5, 1,8 a 2,2 ou 1,9 a 2,1. Em algumas modalidades, a DAR é 1,8, 1,9, 2,0 ou 2,1.

[0048] Em certas modalidades, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:

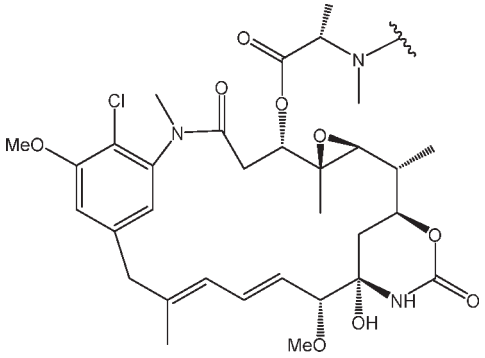


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

q é um número inteiro de 1 ou 10;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



[0049] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências da SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 151 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO: 151 é lisina. Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO: 151 está ausente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 155 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o valor de DAR para uma composição *(*por exemplo*,* composições farmacêuticas) que compreende o imunoconjugado está na faixa de 1,0 a 5,0, 1,0 a 4,0, 1,5 a 4,0, 2,0 a 4,0, 2,5 a 4,0, 2,9 a 3,3, 3,3 a 3,8, 1,5 a 2,5, ou 1,8 a 2,2. Em algumas modalidades, a DAR é menor do que 4,0, menor do que 3,8, menor do que 3,6, menor do que 3,5, menor do que 3,0 ou menor do que 2,5. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 3,0 a 3,2. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 3,5 a 3,7. Em algumas modalidades, a DAR é 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6 ou 3,7. Em algumas mo-

dalidades, a DAR está na faixa de 1,9 a 2,1. Em algumas modalidades, a DAR é 1,9, 2,0 ou 2,1.

[0050] Outro aspecto da presente invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz do imunoconjugado da presente invenção descrito no presente documento e um transportador, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0051] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar uma doença ou afecção associada a ou distinguida pela expressão de ADAM9 em um indivíduo que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz do imunoconjugado ou da composição farmacêutica da presente invenção descrita no presente documento. Também é fornecido na presente invenção o uso do imunoconjugado ou da composição farmacêutica da presente invenção descrita no presente documento no tratamento de uma doença ou afecção associada a ou distinguida pela expressão de ADAM9 em um indivíduo. A presente invenção também fornece o uso do imunoconjugado ou da composição farmacêutica da presente invenção descrita no presente documento para a fabricação de um medicamento para tratar uma doença ou afecção associada a ou distinguida pela expressão de ADAM9 em um indivíduo.

[0052] Em certas modalidades, a doença ou afecção associada a ou distinguida pela expressão de ADAM9 é câncer. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de pulmão de células não pequenas, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer pancreático, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer esofágico, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer cervical, câncer de tireoide, câncer testicular, câncer mieloide, melanoma e câncer linfoide. Em certas modalidades, o câncer é câncer de pulmão de células não pequenas, câncer gástrico, câncer pancreático ou câncer colorretal. Em

certas modalidades, o câncer de pulmão de células não pequenas é carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma ou carcinoma não diferenciado de células grandes. Em certas modalidades, o câncer colorretal é adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma ou carcinoma de células escamosas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0053] **As Figuras 1A** a **1C** apresentam os resultados de estudos de imuno-histoquímica (IHC) e mostram a capacidade de MAB-A para identificar especificamente uma variedade de tipos de câncer de pulmão de células não pequenas **(Figura 1A),** células de câncer de mama, células de câncer de próstata, células de câncer gástrico **(Figura 1B)** e células de câncer de cólon **(Figura 1C)** enquanto o controle de isotipo falhou em identificar especificamente qualquer um destes tipos de células de câncer **(Figuras 1A a 1C).**

[0054] A **Figura 2** apresenta os resultados de estudos de coloração de célula e mostram que MAB-A se liga à ADAM9 humana, e a um grau menor, a ADAM9 de macaco cynomolgus, expressa de modo transiente na superfície de células 293-FT e CHO-K (painéis superior e inferior, respectivamente).

[0055] **As Figuras 3A** a **3B** representam as sequências de aminoácidos do Domínio VH anti-ADAM9 murino alinhado com diversas variantes humanizadas/otimizadas de MAB-A **(Figura 3A, SEQ ID NOs:7, 16,17, 18, 19, 21, 22, 23** e **28)** e o Domínio VL anti-ADAM9 murino alinhado com diversas variantes humanizadas/otimizadas de MAB-A **(Figura 3B, SEQ ID NOs: 11, 54, 55, 56** e **57).** As posições substituídas nas CDRs durante a otimização inicial são sublinhadas conforme o seguinte: a desamidação potencial e os sítios de isomerização são indicados com um sublinhado único, os resíduos de lisina são indicados com sublinhado duplo, resíduos lábeis adicionais são

indicados com um sublinhado tracejado.

[0056] **As Figuras 4A** a **4B** apresentam as curvas de ligação ELISA dos dez clones hMAB-A otimizados selecionados que compreendem variantes de CDR_H3, o hMAB-A parental (2.2) e um anticorpo de controle de isotipo. A **Figura 4A** apresenta as curvas de ligação para cynoADAM9 e a **Figura 4B** apresenta as curvas de ligação para huADAM9.

[0057] **As Figuras 5A** a **5B** apresentam as curvas de ligação de ELISA das variantes Fc. A **Figura 5A** apresenta as curvas de ligação de huADAM9 e a **Figura 5B** apresenta as curvas de ligação para cynoADAM9.

[0058] **As Figuras 6A** a **6B** mostram a coloração de membrana de IHC de ADAM9 em um microarranjo de tecido de carcinoma 20 e membrana de IHC de ADAM e coloração citoplásmica em oito indicações selecionadas, respectivamente.

[0059] **As Figuras 7A** a **7B** mostram a internalização de pulso e internalização contínua de vários conjugados de anticorpo anti-ADAM9.

[0060] A **Figura 8A** mostra a ligação de huFcRn 250 nM e 1000 nM com os anticorpos anti-ADAM9 capturados com e sem a mutação YTE em pH 6,0.

[0061] A **Figura 8B** mostra a ligação de anticorpos anti-ADAM9 25 nM e 100 nM com e sem a mutação YTE ao FcRn imobilizado a pH 6,0.

[0062] **As Figuras 9A, 9B** e **9C** mostra esquemas sintéticos para preparar compostos maitansinoides exemplificativos e imunoconjugados da presente invenção.

[0063] A **Figura 10** mostra curvas de ligação FACS de hMAB-A(2I.2), hMAB-A(2I.2)- sSPDB-DM4, hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-LDL-DM e hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-LDL-DM.

[0064] **As Figuras 11A** e **11B** mostram citotoxicidade *in vitro* de vários imunoconjugados anti-ADAM9 contra várias linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas. Os conjugados à base de IgG1 não alvejados são incluídos como controles negativos.

[0065] **Figura 12** mostra a atividade antitumoral de hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD- DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) no modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas humanas Calu-3.

[0066] A **Figura 13** mostra a atividade antitumoral de hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD- DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) nos xenoenxertos de carcinoma de células escamosas de pulmão de células não pequenas humanas H1703.

[0067] **Figura 14** mostra a atividade antitumoral de hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD- DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) nos xenoenxertos de carcinoma gástrico humano SNU-5.

[0068] A **Figura 15** mostra a atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) em camundongos SCID que portam xenoenxertos de carcinoma de células escamosas de pulmão de células não pequenas humanas EBC-1.

[0069] A **Figura 16** mostra a atividade antitumoral de 25, 50 e 100

µg/kg de carga útil de DM de conjugado hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM e 100 µg/kg de carga útil de DM para o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) de controle não ligante em camundongos sem pelo CD1 que portam xenoenxertos de adenocarcinoma colorretal humano SW48.

[0070] A **Figura 17** mostra a atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugado hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM e 100 µg/kg de carga útil de DM para o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) de controle não ligante em camundongos sem pelo CD1 que portam xenoenxertos de adenocarcinoma pancreático humano HPAF-II.

[0071] **A Figura 18** mostra a atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugado hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(DAR 2,1) e 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) em camundongos sem pelo CD1 que portam xenoenxertos de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas humanas H1975.

[0072] A **Figura 19** mostra a atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(DAR 2,1) e 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) em camundongos sem pelo CD1 que portam xenoenxertos de carcinoma gástrico humano Hs 746T.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0073] A presente invenção direcionada a imunoconjugados que compreendem um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de se ligar especificamente a "Proteína 9 que contém Domínio Desintegrina e Metaloproteinase" **("ADAM9")** conjugada com pelo menos um composto maitansinoide descrito no presente documento. A invenção se refere particularmente a tais imunoconjugados que são de reatividade cruzada com ADAM9 humana e a ADAM9 de um primata não humano *(*por

exemplo, um macaco cynomolgus). A invenção se refere adicionalmente a todos os tais imunoconjugados que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado de modo a exibir imunogenicidade reduzida mediante administração de tais imunoconjugados a um indivíduo recipiente. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer tais imunoconjugados, e a métodos que envolvem o uso de tais imunoconjugados no tratamento de câncer e outras doenças e afecções.

I. ANTICORPOS E SEUS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO

[0074] Os imunoconjugados da presente invenção compreendem um anticorpo que se liga a ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo. **"Anticorpos"** são moléculas de imunoglobulina capazes de se ligar especificamente a um alvo, como um carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, polipeptídeo, *etc.,* através de pelo menos um sítio de reconhecimento de antígeno, localizado no **Domínio Variável** da molécula de imunoglobulina. Conforme usado no presente documento, os termos **"anticorpo"** e **"anticorpos"** se referem anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos sintéticos, anticorpos quiméricos, anticorpos policlonais, anticorpos camelizados, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab, F(ab') fragmentos, intracorpos e fragmentos de ligação de epítopo de qualquer um dos supracitados. Em particular, o termo "anticorpo" inclui moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, por exemplo, moléculas que contêm um sítio de ligação de epítopo. As moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo *(*por exemplo*,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe *(*por exemplo*,* IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) ou subclasse. Nas últimas décadas, um ressurgimento do interesse no potencial terapêutico de

anticorpos tem sido observado, e os anticorpos se tornaram uma das classes principais de fármacos derivados de biotecnologia (Chan, C.E. *et al.* (2009) *"The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases",* Singapore Med. J. 50(7):663-666). Além de seu uso em diagnóstico, os anticorpos se demonstraram úteis como agentes terapêuticos. Mais de 200 fármacos à base de anticorpo foram aprovados para uso ou estão sob desenvolvimento.

[0075] Os anticorpos são capazes de **"se ligar imunoespecificamente"** a um polipeptídeo ou proteína ou uma molécula não proteína devido à presença em tal molécula de um domínio particular ou porção química ou conformação (um **"epítopo").** Uma molécula que contém epítopo pode ter atividade imunogênica, de modo que elicite uma resposta de produção de anticorpos em um animal; tais moléculas são denominadas **"antígenos".** Conforme usado no presente documento, um anticorpo é dito como se ligando **"imunoespecificamente"** a uma região de outra molécula (por exemplo, um epítopo) se o mesmo reage ou se associa mais frequentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade do que a do epítopo em relação aos epítopos alternativos. Por exemplo, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um epítopo viral é um anticorpo que se liga a este epítopo viral com maior afinidade, avidez, mais prontamente e/ou com maior duração do que se liga imunoespecificamente a outros epítopos virais ou a epítopos não virais. Também é entendido lendo-se esta definição que, por exemplo, um anticorpo (ou porção química ou epítopo) que se liga imunoespecificamente a um primeiro alvo pode ou pode não se ligar especificamente ou ligar preferencialmente a um segundo alvo. Como tal, "ligação imunoespecífica" a um epítopo particular não necessariamente necessita (embora possa incluir) de ligação exclusiva a este epítopo. Em geral, mas não necessariamente, a referência à ligação significa ligação "imunoespecífica". Duas moléculas são ditas

como capazes de se ligar uma à outra de maneira **"fisioespecífica"** se tal ligação exibir a especificidade com a qual os receptores se ligam aos seus respectivos ligantes.

[0076] O termo **"anticorpo monoclonal"** se refere a uma população de anticorpo homogênea em que o monoclonal anticorpo é compreendido de aminoácidos (de ocorrência natural ou de ocorrência não natural) que são envolvidos na ligação seletiva de um antígeno. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, direcionados a um epítopo único (ou sítio antigênico). O termo "anticorpo monoclonal" abrange não apenas anticorpos monoclonais intactos e anticorpos monoclonais de comprimento completo, como também fragmentos dos mesmos (como Fab, Fab', $F(ab')_2$ Fv), cadeia única (scFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, anticorpos monoclonais humanizados, anticorpos monoclonais quiméricos e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento de antígeno da especificidade necessária e a capacidade de se ligar a um antígeno. O termo não é destinado a ser limitado em relação à fonte do anticorpo ou à maneira na qual é feito *(*por exemplo*,* por hibridoma, seleção de fago, expressão recombinante, animais transgênicos, *etc.).* O termo inclui imunoglobulinas integrais, assim como os fragmentos *etc.* descritos acima da definição de "anticorpo". Os métodos para produzir anticorpos monoclonais são conhecidos na técnica. Um método que pode ser usado é o método de Kohler, G. *et al.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity",* Nature 256:495-497, ou uma modificação do mesmo. Tipicamente, os anticorpos monoclonais são desenvolvidos em camundongos, ratos ou coelhos. Os anticorpos são produzidos imunizando-se um animal com uma quantidade imunogênica de células, extratos de célula ou preparações de proteína que contêm o epítopo desejável. O imunógeno po-

de ser, mas sem limitação, células primárias, linhagens celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos ou tecido. As células usadas para imunização podem ser cultivadas por um período de tempo *(*por exemplo, pelo menos 24 horas) antes de seu uso como um imunógeno. As células podem ser usadas como imunógenos em si ou em combinação com um adjuvante não desnaturante, como Ribi (consultar, por exemplo*,* Jennings, V.M. (1995) *"Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production",* ILAR J. 37(3): 119-125). Em geral, as células devem ser mantidas intactas e preferencialmente viáveis quando usadas como imunógenos. As células intactas podem permitir que os antígenos sejam mais bem detectados do que as células rompidas pelo animal imunizado. O uso de adjuvantes desnaturantes ou severos, por exemplo*,* adjuvante de Freund, pode romper as células e, portanto, é desmotivado. O imunógeno pode ser administrado múltiplas vezes em intervalos periódicos, como duas vezes na semana, ou uma vez na semana, ou pode ser administrado de modo que mantenha viabilidade no animal *(*por exemplo*,* em um tecido recombinante). Alternativamente, os anticorpos monoclonais existentes e quaisquer outros anticorpos equivalentes que são imunoespecíficos para um epítopo patogênico desejável podem ser sequenciados e produzidos recombinantemente por quaisquer meios conhecidos na técnica. Numa modalidade, tal anticorpo é sequenciado e a sequência polinucleotídica é, então, clonada em um vetor para expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vetor numa célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser, então, expandida e congelada para futuro uso. A sequência polinucleotídica de tais anticorpos pode ser usada para manipulação genética para gerar uma afinidade otimizada, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado e/ou um anticorpo caninizado, para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo, as-

sim como os imunoconjugados da invenção. O princípio geral em humanizar um anticorpo envolve reter a sequência básica da porção de ligação ao antígeno do anticorpo, enquanto se troca o restante não humano do anticorpo por sequências de anticorpo humano.

[0077] Os anticorpos naturais (como anticorpos de IgG natural) são compostos de duas **"Cadeias Leves"** complexados com duas **"Cadeias Pesadas".** Cada Cadeia Leve contém um Domínio Variável **("VL")** e um Domínio Constante **("CL").** Cada Cadeia Pesada contém um Domínio Variável **("VH"),** três Domínios Constantes **("CH1", "CH2"** e **"CH3"),** e uma Região de **"Articulação" ("H")** localizada entre os Domínios **CH1** e **CH2**. Em contraste, scFvs são moléculas de cadeia única produzidas ligando-se Domínios Variáveis de e Cadeia Leve e Pesada por meio de um peptídeo de ligação curto.

[0078] A unidade estrutural básica de imunoglobulinas de ocorrência natural *(*por exemplo*,* IgG) é, deste modo, um tetrâmero que tem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, usualmente expressa como uma glicoproteína de cerca de 150000 Da. A porção amino-terminal **("N-terminal")** de cada cadeia inclui um Domínio Variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis para reconhecimento de antígeno. A porção carbóxi-terminal **("C-terminal")** de cada cadeia define uma região constante, com cadeias leves que têm um Domínio Constante único e cadeias pesadas que têm usualmente três Domínios Constantes e uma Região de Articulação. Deste modo, a estrutura das cadeias leves de uma molécula de IgG é n-VL-CL-c e a estrutura das cadeias pesadas de IgG é **n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c** (quando n e c representam, respectivamente, o terminal N e o terminal C do polipeptídeo).

A. CARACTERÍSTICAS DE DOMÍNIOS VARIÁVEIS DE ANTICORPO

[0079] Os Domínios Variáveis de uma molécula de IgG consistem em 1, 2, e mais comumente 3, regiões determinantes de complemen-

taridade **("CDR",** isto é*,* **CDR1, CDR2** e **CDR3,** respectivamente), que contêm os resíduos em contato com epítopo, e segmentos não CDR, denominados **regiões de framework ("FR"),** que, em geral, mantêm a estrutura e determinam o posicionamento das regiões CDR de modo a permitir tal contato (embora certos resíduos de framework também possam fazer contato com o epítopo). Deste modo, os Domínios VL e VH têm tipicamente a estrutura: **n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c** (em que "n" denota o terminal N e "c" denota o terminal C). Polipeptídeos que são (ou podem ser vir como) o primeiro, segundo, terceiro e quarto FR da Cadeia Leve de um anticorpo são designados no presente documento, respectivamente, como: **Domínio FR_L1, Domínio FR_L2, Domínio FR_L3** e **Domínio FR_L4.** De modo similar, os polipeptídeos que são (ou podem ser vir como) o primeiro, segundo, terceiro e quarto FR da Cadeia Pesada de um anticorpo são designados no presente documento, respectivamente, como: **Domínio de FR_H1, Domínio de FR_H2, Domínio de FR_H3** e **Domínio de FR_H4.** Polipeptídeos que são (ou podem ser vir como) o primeiro, segundo e terceiro CDR da Cadeia Leve de um anticorpo são designados no presente documento, respectivamente, como: **Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2 e Domínio de CDR_L3.** De modo similar, os polipeptídeos que são (ou podem ser vir como) o primeiro, segundo e terceiro CDR da Cadeia Pesada de um anticorpo são designados no presente documento, respectivamente, como: **Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2 e Domínio de CDR_H3.** Deste modo, os termos Domínio de CDR_L1, Domínio de CDR_L2, Domínio de CDR_L3, Domínio de CDR_H1, Domínio de CDR_H2, e Domínio de CDR_H3 são direcionados a polipeptídeos que, quando incorporados em um anticorpo, fazem com que o anticorpo possa se ligar a um epítopo específico.

[0080] Ao longo do presente relatório específico, a numeração dos resíduos nos Domínios Variáveis das cadeias pesada e leve maduras

de imunoglobulinas é designada pela posição de um aminoácido na cadeia. Kabat descreveu várias sequências de aminoácidos para anticorpos, identificou uma sequência de consenso de aminoácidos para cada subgrupo e atribuiu um número de resíduo para cada aminoácido, e as CDRs são identificadas conforme definido por Kabat (será entendido que CDR_H1, conforme definido por Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins",* J. Mol. Biol. 196:901-917) começa em cinco resíduos mais cedo). O esquema de numeração de Kabat é extensível a anticorpos não incluídos neste compêndio alinhando-se o anticorpo em questão com uma dentre as sequências de consenso em Kabat por referência a aminoácidos conservados. Este método para atribuir números de resíduos se tornou padrão no campo e identifica prontamente os aminoácidos em posições equivalentes em anticorpos diferentes, incluindo variantes quiméricas ou humanizadas. Por exemplo, um aminoácido na posição 50 de uma cadeia leve de anticorpo humano ocupa a posição equivalente a um aminoácido na posição 50 de uma cadeia leve de anticorpo de camundongo.

[0081] A capacidade de um anticorpo se ligar a um epítopo de um antígeno depende da presença e da sequência de aminoácidos dos Domínios VL e VH do anticorpo. A interação de uma Cadeia Leve e Cadeia Pesada do anticorpo e, em particular, a interação de seus Domínios VL e VH forma um dos dois sítios de ligação de epítopo de um anticorpo natural, como uma IgG. Os anticorpos têm capacidade de se ligar apenas a uma espécie de epítopo (por exemplo, são monoespecíficos), embora possam se ligar a múltiplas cópias desta espécie de epítopo (por exemplo, exibir bivalência ou multivalência).

[0082] Consequentemente, conforme usado no presente documento, o termo **"fragmento de ligação de epítopo"** significa um fragmento de um anticorpo capaz de se ligar imunoespecificamente a um

epítopo, e o termo **"sítio de ligação de epítopo"** se refere a uma porção de uma molécula que compreende um fragmento de ligação de epítopo. Um fragmento de ligação de epítopo pode conter qualquer um dos 1, 2, 3, 4 ou 5 Domínios de CDR de um anticorpo, ou pode conter todos os 6 dos Domínios de CDR de um anticorpo e, embora capaz de se ligar imunoespecificamente a tal epítopo, pode exibir uma imunoespecificidade, afinidade ou seletividade em direção a tal epítopo que difere daquele de tal anticorpo. Preferencialmente, entretanto, um fragmento de ligação de epítopo conterão todos os 6 dos Domínios de CDR de tal anticorpo. Um fragmento de ligação de epítopo de um anticorpo pode ser uma cadeia de polipeptídeo única (por exemplo, um scFv), ou pode compreender duas ou mais cadeias de polipeptídeo que têm, cada uma, um terminal amino e um terminal carbóxi (por exemplo, um fragmento Fab, um fragmento Fab_2, *etc*.). A menos que especificamente observado, a ordem dos domínios das moléculas de proteína descritos no presente documento está na direção **"N-terminal a C-terminal"**.

[0083] A invenção também abrange imunoconjugados que compreendem fragmentos de Domínio Variável de cadeia única **("scFv")** que compreendem um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 da invenção. Os fragmentos de Domínio Variável de cadeia única compreendem Domínios VL e VH que são ligados com o uso de um peptídeo "Ligante" curto. Tais ligantes podem ser modificados para fornecer funções adicionais, de modo a permitir a fixação de um fármaco ou permitir fixação a um suporte sólido. As variantes de cadeia única podem ser produzidas de modo recombinante ou sintético. Para a produção sintética de scFv, um sintetizador automatizado pode ser usado. Para a produção recombinante de scFv, um plasmídeo adequado que contém polinucleotídeo que codifica o scFv pode ser introduzido numa célula hospedeira adequada, eucariótica, como células de levedura, vegetais,

de inseto ou mamífero, ou procariótica, como E. coli. Os polinucleotídeos que codificam o scFv de interesse podem ser feitos por manipulações rotineiras, como ligação de polinucleotídeos. O scFv resultante pode ser isolado com o uso de técnicas de purificação de proteína padrão conhecidas na arte.

[0084] A invenção também abrange particularmente os imunoconjugados que compreendem os Domínios de CDR_H1, CDR_H2, CDR_H3, CDR_L1, CDR_L2 e CDR_L3 de variantes humanizadas/otimizadas dos anticorpos anti-ADAM9 da invenção, assim como Domínios VL que contêm quaisquer 1, 2 ou 3 de tais CDR_Ls e Domínios VH que contêm quaisquer 1, 2 ou 3 de tais CDR_Hs, assim como moléculas de ligação multiespecífica que compreendem os mesmos. O termo anticorpo **"humanizado"** se refere a uma molécula quimérica que tem um sítio de ligação de epítopo de uma imunoglobulina de uma espécie não humana e uma estrutura de imunoglobulina restante que tem base na estrutura e/ou sequência de uma imunoglobulina humana. Os anticorpos humanizados são geralmente preparados com o uso de técnicas recombinantes. Os imunoconjugados da presente invenção podem compreender variantes humanizadas, quiméricas ou caninizadas de um anticorpo que é designado no presente documento como "MAB-A". As sequências polinucleotídicas que codificam os Domínios Variáveis de MAB-A podem ser usadas para manipulação genética para gerar derivados de MAB-A que possuem características melhoradas ou alteradas *(*por exemplo*,* afinidade, reatividade cruzada, especificidade, *etc.)*. O princípio geral em humanizar um anticorpo envolve reter a sequência básica da porção de ligação ao epítopo do anticorpo, enquanto se troca o restante não humano do anticorpo por sequências de anticorpo humano. Há quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. As mesmas são: (1) determinar o nucleotídeo e a sequência de aminoácidos prevista dos domínios variáveis leve e pesado

de anticorpo inicial; (2) projetar o anticorpo humanizado ou anticorpo caninizado, isto é, decidir qual região de framework de anticorpo usar durante o processo de humanização ou canonização; (3) usar as metodologias/técnicas de humanização ou caninização reais; e (4) transfectar e expressar o anticorpo humanizado. Consultar, por exemplo, as Patentes US nº 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; e 6.331.415. O termo anticorpo **"otimizado"** se refere a um anticorpo que tem pelo menos um aminoácido que é diferente do anticorpo parental em pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) na região variável de cadeia leve ou cadeia pesada, que confere uma afinidade de ligação mais alta, afinidade de ligação (por exemplo, 2 vezes ou mais) mais alta à ADAM9 humana e/ou ADAM9 de macaco cynomolgus em comparação com o anticorpo parental. Será entendido a partir do ensinamento fornecido no presente documento que os anticorpos da invenção podem ser humanizados, otimizados ou tanto humanizados quanto otimizados.

[0085] O sítio de ligação de epítopo pode compreender um Domínio Variável completo fundido a um ou mais Domínios Constantes ou apenas as CDRs de tal Domínio Variável enxertado a regiões de framework apropriadas. Os sítios de ligação ao epítopo podem ser de tipo selvagem ou podem ser modificados por uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácido. Tal ação elimina parcial ou completamente a capacidade de a Região Constante servir como um imunógeno em recipientes *(*por exemplo, indivíduos humanos), entretanto, a possibilidade de uma resposta imune ao Domínio Variável estranho permanece (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) *"Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response",* Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 86:4220-4224). Outra abordagem foca não apenas em fornecer regiões constantes derivadas humanas, como também na modificação de Domínios Variáveis de modo a conformar

novamente os mesmos de modo mais próximo possível de uma forma em imunoglobulinas humanas. Sabe-se que os Domínios Variáveis tanto das Cadeias Pesadas quanto Leves de anticorpos contêm três CDRs que variam em resposta aos antígenos em questão e determinam a capacidade de ligação, flanqueadas pelas quatro regiões de framework, que são relativamente conservadas numa dada espécie e que fornecem putativamente um arcabouço para as CDRs. Quando os anticorpos não humanos são preparados em relação a um antígeno particular, os domínios variáveis podem ser "conformados novamente" ou "humanizados" enxertando-se CDRs derivados de anticorpo não humano nas FRs presentes no anticorpo humano a ser modificado. A aplicação desta abordagem a vários anticorpos foi relatada por Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies for Therapy",* Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity",* Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) *"Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation",* Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) *"Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity",* Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) *"Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody",* Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) *"Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo",* Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) *"Humanized Anticorpos For Antiviral Therapy",* Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) *"Humanization Of An Anti-pl85her2 Antibody For Human Cancer Therapy",* Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 89:4285-4289; e Co, M.S. *et al.* (1992) *"Chimeric And Humanized Anticorpos With Specificity For The CD33 Antigen",* J.

Immunol. 148:1149-1154. Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados conservam todas as sequências de CDR (por exemplo, um anticorpo murino humanizado que contém todas as seis das CDRs presentes no anticorpo murino). Em outras modalidades, anticorpos humanizados têm uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) que diferem em sequência em relação às CDRs do anticorpo original.

[0086] Várias moléculas de anticorpo humanizadas que compreendem um sítio de ligação de epítopo derivado de uma imunoglobulina não humana foram descritos, incluindo anticorpos quiméricos que têm Domínio Variável de roedor ou roedor modificado e suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) associadas fundidas aos domínios constantes humanos (consultar, por exemplo, Winter *et al.* (1991) *"Man-made Antibodies"* Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) *"Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response",* Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 86:4220-4224; Shaw *et al.* (1987) *"Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1 A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen",* J. Immunol. 138:4534-4538; e Brown *et al.* (1987) *"Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody",* Cancer Res. 47:3577-3583). Outras referências descrevem CDRs de roedor enxertados numa região de framework (FR) humana de suporte antes da fusão com um Domínio Constante de anticorpo humano apropriado (consultar, por exemplo, Riechmann, L. *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies for Therapy",* Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity",* Science 239:1534-1536; e Jones *et al.* (1986) *"Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse",* Nature 321:522-525). Outra referência descreve CDRs de roedor suportadas por regiões de

framework de roedor folheadas de modo recombinante (consultar, por exemplo, Publicação de Patente Europeia Nº 519.596). Estas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar a resposta imunológica indesejável em direção a moléculas de anticorpo anti-humano de roedor, que limita a duração e a eficácia de aplicações terapêuticas destas porções químicas em recipientes humanos. Outros métodos para humanizar anticorpos que também podem ser utilizados são descritos por Daugherty *et al.* (1991) *"Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins",* Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 e nas Patentes US nº 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; e 5.866.692.

B. CARACTERÍSTICAS DE DOMÍNIOS CONSTANTES DE ANTICORPO

[0087] Ao longo do presente relatório específico, a numeração dos resíduos na região constante de uma cadeia pesada de IgG é aquela do índice EU, como em Kabat *et al.,* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) **("Kabat"),** expressamente incorporado ao presente documento, a título de referência. O termo **"o índice EU, conforme apresentado em Kabat"** se refere à numeração dos Domínios Constantes de anticorpo EU de IgG1 humana fornecida em Kabat. Este método para atribuir números de resíduos se tornou padrão no campo e identifica prontamente os aminoácidos em posições equivalentes nas regiões constantes de isotipos de anticorpo.

1. REGIÕES CONSTANTES DA CADEIA LEVE

[0088] Conforme indicado acima, cada Cadeia Leve de um anticorpo contém um Domínio Variável **("VL")** e um Domínio Constante **("CL").**

[0089] Um Domínio CL é um Domínio Kappa CL de IgG humana.

A sequência de aminoácidos de um Domínio Kappa CL humano exemplificativo é **(SEQ ID NO:69):**

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVD-NALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

[0090] Alternativamente, um Domínio CL exemplificativo é um Domínio Lâmbda CL de IgG humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio Lâmbda CL humano exemplificativo é **(SEQ ID NO:70):**

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

2. REGIÕES CONSTANTES DA CADEIA PESADA

A. REGIÕES FC DE OCORRÊNCIA NATURAL

[0091] Conforme fornecido no presente documento, os imunoconjugados da invenção podem compreender uma Região Fc. A Região Fc de tais imunoconjugados da invenção pode ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4). Os imunoconjugados da invenção podem compreender adicionalmente um Domínio CH1 e/ou uma Região de Articulação. Quando presente, o Domínio CH1 e/ou Região de Articulação pode ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), e é preferencialmente do mesmo isotipo que a Região Fc desejável.

[0092] A Região Fc dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção podem ser uma Região Fc completa *(*por exemplo, uma Região Fc de IgG completa) ou apenas um fragmento de uma Região Fc. Opcionalmente, a Região Fc dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção não tem o resíduo de aminoácido de lisina C-terminal.

[0093] Os Domínios CH1 das duas cadeias pesadas de um anticorpo fazem complexo com a região constante da Cadeia Leve "CL"

do anticorpo, e são ligados às cadeias pesadas de Domínios CH2 por meio de uma Região de Articulação interveniente.

[0094] Um Domínio CH1 exemplificativo é um Domínio CH1 de IgG1 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG1 humana exemplificativo é **(SEQ ID NO:71):**

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNS-GALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICN-VNHKPS NTKVDKRV

[0095] Um Domínio CH1 exemplificativo é um Domínio CH1 de IgG2 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG2 humana exemplificativo é **(SEQ ID NO:72):**

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNS-GALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNV-DHKPS NTKVDKTV

[0096] Um Domínio CH1 exemplificativo é um Domínio CH1 de IgG4 humana. A sequência de aminoácidos de um Domínio CH1 de IgG4 humana exemplificativo é **(SEQ ID NO:73):**

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNS-GALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNV-DHKPS NTKVDKRV

[0097] Uma Região de Articulação exemplificativa é um Região de Articulação de IgG1 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Articulação de IgG1 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:74):**

EPKSCDKTHTCPPCP.

[0098] Outra Região de Articulação exemplificativa é um Região de Articulação de IgG2 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Articulação de IgG2 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:75):**

ERKCCVECPPCP.

[0099] Outra Região de Articulação exemplificativa é um Região de Articulação de IgG4 humana. A sequência de aminoácidos de uma Região de Articulação de IgG4 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:76):** ESKYGPPCPSCP. Conforme descrito acima, uma Região de Articulação de IgG4 pode compreender uma mutação de estabilização, como a substituição S228P. A sequência de aminoácidos de uma Região de Articulação de IgG4 estabilizada exemplificativa é **(SEQ ID NO:77):** ESKYGPPCPPCP.

[00100] Os Domínios CH2 e CH3 das duas Cadeias Pesadas de um anticorpo interagem para formar uma **"Região Fc"** que é um domínio que é reconhecido por **"Receptores Fc"** celulares incluindo, mas sem limitação, Receptores Fc gama **("**FcγR**s"). ** Conforme usado no presente documento, o termo "Região Fc" é usado para definir a região C-terminal de uma Cadeia Pesada de IgG que compreende os Domínios CH2 e CH3 desta cadeia. Uma Região Fc é dita como de um isotipo, classe ou subclasse de IgG particular se sua sequência de aminoácidos é mais homóloga a este isotipo, em relação a outros isotipos de IgG.

[00101] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG1 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:1):**

```
231      240        250        260        270        280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

         290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

         340        350        360        370        380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

         390        400        410        420        430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

         440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

conforme numerado pelo índice EU, conforme apresentado em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00102] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma

IgG2 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:2):**

```
231       240         250         260         270         280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

          340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

          390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

conforme numerado pelo índice EU, conforme apresentado em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00103] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG3 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:3):**

```
231       240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

          290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390         400         410         420         430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

          440     447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

conforme numerado pelo índice EU, conforme apresentado em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00104] A sequência de aminoácidos do Domínio CH2-CH3 de uma IgG4 humana exemplificativa é **(SEQ ID NO:4):**

```
231      240        250        260        270        280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

         290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

         340        350        360        370        380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

         390        400        410        420        430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

         440     447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

conforme numerado pelo índice EU, conforme apresentado em Kabat, em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00105] Os polimorfismos foram observados em várias posições diferentes em regiões constantes de anticorpo (por exemplo, posições de Fc, incluindo, mas sem limitação, as posições 270, 272, 312, 315, 356 e 358 conforme numerado pelo índice EU conforme apresentado em Kabat), e, deste modo, diferenças leves entre a sequência apresentada e sequências no estado da técnica podem existir. As formas polimórficas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas. No presente, 18 alótipos de Gm são conhecidos: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis of Structure, Function And Regulation".* Pergamon, Oxford, páginas 43-78 (1990); Lefranc, G. *etal.,* 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). É especificamente contemplado que os anticorpos da presente invenção podem incorporar qualquer alótipo, isoalótipo ou haplótipo de qualquer gene de imunoglobulina, e não são limitados ao alótipo, isoalótipo ou haplótipo das sequências fornecidas no presente documento. Adicionalmente, em alguns sistemas de expressão, o resíduo de aminoácido C-terminal (em negrito acima) do Domínio CH3 pode ser removido pós-tradução. Consequentemente, o resíduo C-terminal do Domínio CH3 é um resíduo de aminoácido opcional nos imunoconjugados da inven-

ção. Os imunoconjugados que não têm o resíduo C-terminal do Domínio CH3 são especificamente abrangidos pela presente invenção. Tais construtos que compreendem o resíduo de lisina C-terminal do Domínio CH3 também são especificamente abrangidos pela presente invenção.

B. RECEPTORES FCΓ (FCΓRS)

[00106] Em função imune tradicional, a interação de complexos de anticorpo-antígeno com células do sistema imune resulta em um amplo arranjo de respostas, na faixa de funções efetoras, como toxicidade dependente de anticorpo, degranulação de mastócitos e fagocitose a sinais imunomoduladores, como regular proliferação de linfócito e secreção de anticorpo. Todas estas interações são iniciadas através da ligação da Região Fc de anticorpos ou complexos imunes a receptores de superfície de célula especializada em células hematopoiéticas, e particularmente a receptores (denominados de modo singular como um **"receptor gama Fc",** "FcγR**"** e coletivamente como **"**FcγR**s")** encontrados nas superfícies de múltiplos tipos de células de sistema imune *(*por exemplo, linfócitos B, células dendríticas foliculares, células exterminadoras naturais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos).

[00107] A diversidade de respostas celulares acionadas por anticorpos e resultados complexos imunes da heterogeneidade estrutural dos três receptores Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) e FcγRIII (CD16) são receptores de ativação (por exemplo, intensificação de sistema imune); FcγRIIB (CD32B) é um receptor de inibição (por exemplo, supressão de sistema imune). Além disto, a interação com o Receptor Fc neonatal (FcRn) media a reciclagem de moléculas de IgG do endossomo à superfície de célula e liberação no sangue. A sequência de aminoácidos de IgG1 **(SEQ ID NO:1),** IgG2 **(SEQ ID NO:2),** IgG3 **(SEQ ID**

NO:3) e IgG4 **(SEQ ID NO:4)** de tipo selvagem exemplificativa é apresentada acima.

[00108] A capacidade das FcγRs diferentes de mediar funções diametricamente opostas reflete diferenças estruturais entre as FcγRs diferentes e, em particular, reflete se o FcγR ligado possui um Motivo de Ativação de Imunorreceptor com base em Tirosina **("ITAM")** ou um Motivo Inibidor de Imunorreceptor com base em Tirosina **("ITIM").** O recrutamento de enzimas citoplásmicas diferentes para estas estruturas dita o resultado das respostas celulares mediadas por FcγR. FcγRs que contêm ITAM incluem FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, e ativam o sistema imune quando ligados a Regiões Fc (por exemplo, Regiões Fc agregadas presentes em um complexo imune). FcγRIIB é o único FcγR que contém ITIM natural atualmente conhecido; o mesmo atua para suprimir ou inibir o sistema imune quando ligado a Regiões Fc agregadas. Os neutrófilos humanos expressam o gene FcγRIIA. O agrupamento de FcγRIIA por meio de complexos imunes ou reticulação de anticorpo específico serve para agregar ITAMs com quinases associadas a receptor que facilita a fosforilação de ITAM. A fosforilação de ITAM serve como um sítio de encaixe para Syk kinase, cuja ativação resulta na ativação de substratos a jusante (por exemplo, PI_3K). A ativação celular leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios. O gene FcγRIIB é expresso em linfócitos B; seu domínio extracelular é 96% idêntico a FcγRIIA e liga complexos de IgG de maneira não distinguível. A presença de um ITIM no domínio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclasse inibidora de FcγR. Recentemente a base molecular desta inibição foi estabelecida. Quando coligado juntamente com um FcγR de ativação, o ITIM em FcγRIIB se torna fosforilado e atrai o domínio SH2 da inositol polifosfato 5'-fosfatase (SHIP), que hibrolisa mensageiros de fosfoinositol liberados como uma consequência de ativação de tirosina quinase mediada por FcγR que contém

ITAM, impedindo consequentemente o influxo de Ca^{++} intracelular. Deste modo, a reticulação de FcγRIIB suprime a resposta de ativação à ligação de FcγR e inibe a responsividade celular. A ativação de células B, proliferação de células B e a secreção de anticorpos são, deste modo, abortadas.

C. REGIÕES FC VARIANTES

[00109] A modificação da Região Fc pode levar a um fenótipo alterado, por exemplo, meia-vida sérica alterada, estabilidade alterada, suscetibilidade alterada a enzimas celulares ou função de efetor alterada. Pode ser desejável, portanto, modificar uma molécula que contém Região Fc da presente invenção em relação à função efetora, por exemplo, de modo a intensificar a eficácia de tal molécula no tratamento de câncer. A redução ou a eliminação de uma função efetora é desejável em certos casos, por exemplo, no caso de anticorpos cujo mecanismo de ação envolve bloqueio ou antagonismo, mas não exterminando as células que portam um antígeno alvo. A função efetora aumentada é, em geral, desejável quando direcionada a células indesejáveis, como células tumorais e estranhas, quando os FcγRs são expressados em baixos níveis, por exemplo, células B específicas de tumor com baixos níveis de FcγRIIB (por exemplo, linfoma não Hodgkin, CLL e linfoma de Burkitt). Os imunoconjugados da invenção que possuem tal função efetora conferida ou alterada são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença, distúrbio ou infecção em que uma eficácia intensificada de atividade de função efetora é desejável.

[00110] Consequentemente, em certas modalidades, a Região Fc dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção pode ser uma Região Fc variante manipulada. Embora a Região Fc de imunoconjugados da presente invenção possa possuir a capacidade de se ligar a um ou mais receptores Fc (por exemplo, FcγR (ou FcγRs)), mais preferencialmente, tal Região Fc variante tem ligação

alterada a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD16b) (em relação à ligação exibida por uma Região Fc de tipo selvagem), por exemplo, terá ligação intensificada a um receptor de ativação e/ou terá capacidade substancialmente reduzida ou nenhuma capacidade de se ligar a receptor inibidor (ou receptores inibidores). Deste modo, a Região Fc dos imunoconjugados da presente invenção pode incluir parte ou todo o Domínio CH2 e/ou parte ou todo o Domínio CH3 de uma Região Fc completa, ou pode compreender uma sequência CH2 variante e/ou CH3 variante (que pode incluir, por exemplo, uma ou mais inserções e/ou uma ou mais deleções em relação aos domínios CH2 ou CH3 de uma Região Fc completa). Tais Regiões Fc podem compreender porções de polipeptídeo não Fc, ou podem compreender porções de Regiões Fc não naturalmente completas, ou podem compreender orientações de ocorrência não natural de Domínios CH2 e/ou CH3 (como, por exemplo, dois domínios CH2 ou dois domínios CH3, ou na direção N-terminal a C-terminal, um Domínio CH3 ligado a um Domínio CH2, *etc.).*

[00111] As modificações de Região Fc identificadas como alterando a função efetora são conhecidas na técnica, incluindo modificações que aumentam a ligação a receptores de ativação (por exemplo, FcγRIIA (CD16A) e reduzem a ligação a receptores inibidores (por exemplo, FcγRIIB (CD32B) (consultar, por exemplo, Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) "Fc *Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low- Affinity Activating Fcgamma Receptors",* Cancer Res. 57(18):8882-8890). A **Tabela 1** lista substituições únicas, duplas, triplas, quádruplas e quíntuplas exemplificativas (a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat, e as substituições são relativas à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO**:1)** de modificação exemplificativa que aumenta a ligação a receptores de ativação e/ou reduzem a

ligação a receptores inibidores.

Tabela 1 **Variações de Regiões Fc de Ativação Preferenciais**			
Variações de Sítio Único			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Variações de Sítio Duplo			
F243L e R292P	F243L e Y300L	F243L e P396L	R292P e Y300L
D270E e P396L	R292P e V305I	P396L e Q419H	P247L e N421K
R292P e P396L	Y300L e P396L	R255L e P396L	R292P e P305I
K392T e P396L			
Variações de Sítio Triplo			
F243L, P247L e N421K		P247L, D270E e N421K	
F243L, R292P e Y300L		R255L, D270E e P396L	
F243L, R292P e V305I		D270E, G316D e R_{41}6G	
F243L, R292P e P396L		D270E, K392T e P396L	
F243L, Y300L e P396L		D270E, P396L e Q419H	
V284M, R292L e K370N		R292P, Y300L e P396L	
Variações de Sítio Quádruplo			
L234F, F243L, R292P e Y300L		F243L, P247L, D270E e N421K	
L234F, F243L, R292P e Y300L		F243L, R255L, D270E e P396L	
L235I, F243L, R292P e Y300L		F243L, D270E, G316D e R416G	
L235Q, F243L, R292P e Y300L		F243L, D270E, K392T e P396L	
P247L, D270E, Y300L e N421K		F243L, R292P, Y300L e P396L	
R255L, D270E, R292G e P396L		F243L, R292P, V305I e P396L	
R255L, D270E, Y300L e P396L		F243L, D270E, P396L e Q419H	
D270E, G316D, P396L e R416G			

Tabela 1 **Variações de Regiões Fc de Ativação Preferenciais**	
Variações de Sítio Quíntuplo	
L235V, F243L, R292P, Y300L e P396L	F243L, R292P, V305I, Y300L e P396L
L235P, F243L, R292P, Y300L e P396L	

[00112] As variantes exemplificativas de Regiões Fc de IgG1 humana com ligação reduzida a CD32B e/ou ligação aumentada a CD16A contêm substituições F243L, R292P, Y300E, V305I ou P396L, em que a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat. Estas substituições de aminoácido podem estar presentes numa Região Fc de IgG1 humana em qualquer combinação. Numa modalidade, a Região Fc de IgG1 humana variante contém uma substituição F243L, R292P e Y300L. Em outra modalidade, a Região Fc de IgG1 humana variante contém uma substituição F243L, R292P, Y300L, V305I e P396L.

[00113] Em certas modalidades, é preferencial que as Regiões Fc dos imunoconjugados da presente invenção exibam ligação diminuída (ou substancialmente nenhuma) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) ou FcγRIIIB (CD 16b) (em relação à ligação exibida pela Região Fc de IgG1 de tipo selvagem **(SEQ ID NO:1).** Numa modalidade específica, os imunoconjugados da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG que exibe a função efetora de ADCC reduzida. Numa modalidade preferencial, os Domínios CH2-CH3 de imunoconjugados incluem quaisquer 1, 2, 3 ou 4 das substituições: E234A, E235A, D265A, N297Q e N297G, em que a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat. Em outra modalidade, os Domínios CH2-CH3 contêm uma substituição N297Q, uma substituição N297G, L234A e E235A substituições ou uma substituição D265A, visto que estas mutações anulam a ligação FcR. Alternativamente, um Domínio CH2-CH3 de uma região Fc de ocorrência natural

que exibe inerentemente a ligação diminuída (ou substancialmente nenhuma) a FcγRIIIA (CD 16a) e/ou função efetora reduzida (em relação à ligação e função efetora exibida pela Região Fc de IgG1 de tipo selvagem **(SEQ ID NO:1))** é utilizado. Numa modalidade específica, os imunoconjugados da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG2 **(SEQ ID NO:2)** ou uma Região Fc de IgG4 **(SEQ ID NO:4).** Quando uma Região Fc de IgG4 é utilizada, a presente invenção também abrange a introdução de uma mutação de estabilização, como a substituição de Região de Articulação S228P descrita acima (consultar, por exemplo, **SEQ ID NO:77).** Visto que as substituições N297G, N297Q, L234A, E235A e D265A anulam a função efetora, em circunstâncias nas quais a função efetora é desejável, estas substituições não seriam preferencialmente usadas.

[00114] Uma sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção que tem função efetora reduzida ou anulada compreenderá as substituições L234A/E235A (mostradas sublinhadas) **(SEQ ID NO:78):**

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00115] Uma segunda sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção compreende uma substituição S442C (mostrada sublinhada) que permite que dois domínios CH3 sejam covalentemente ligados entre si por meio de uma ligação dissulfeto ou conjugação de um agente farmacêutico. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO:79):**

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00116] Uma terceira sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção compreendem as substituições L234A/L235A (mostradas sublinhadas) que reduzem ou abolem a função efetora e a substituição S442C (mostrada sublinhada) que permite que dois domínios CH3 sejam covalentemente ligados entre si por meio de uma ligação dissulfeto ou conjugação de um agente farmacêutico. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO:80):**

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00117] A meia-vida sérica de proteínas que compreendem Regiões Fc pode ser aumentada aumentando-se a afinidade de ligação da Região Fc para FcRn. O termo "meia-vida", conforme usado no presente documento, significa uma propriedade farmacocinética de uma molécula que é uma medida do tempo de sobrevivência das moléculas após sua administração. A meia-vida pode ser expressada como o tempo necessário para eliminar cinquenta por cento (50%) de uma quantidade conhecida da molécula do corpo de um indivíduo (por exemplo, um paciente humano ou outro mamífero) ou um compartimento específico do mesmo, por exemplo, conforme medido em soro, isto é, meia-vida de circulação, ou em outros tecidos. Em geral, um aumento na meia-vida resulta em um aumento em tempo de residência médio (MRT) em circulação para a molécula administrada.

[00118] Em algumas modalidades, os imunoconjugados da presente invenção compreendem uma Região Fc variante que compreende pelo menos uma modificação de aminoácido em relação a uma Região Fc de tipo selvagem, de modo que a dita molécula tenha uma meia-vida aumentada (em relação a uma molécula que compreende uma Região Fc de tipo selvagem). Em algumas modalidades, os imunoconjugados da presente invenção compreendem uma Região Fc de IgG variante, em que a dita Região Fc variante compreende uma meia-vida que estende a substituição de aminoácido numa ou mais posições selecionadas do grupo que consiste em 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 e 436, em que a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat. Várias mutações capazes de aumentar a meia-vida de uma molécula que contém Região Fc são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, M252Y, S254T, T256E e combinações dos mesmos. Por exemplo, consultar as mutações descritas nas Patentes US nº 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; Publicações US nº 2002/0147311; 2007/0148164; e Publicações PCT nº WO 98/23289; WO 2009/058492; e WO 2010/033279, que são incorporados ao presente documento a título de referência, em suas totalidades. Os imunoconjugados com meia-vida intensificada também incluem aqueles que possuem Regiões Fc variantes que compreendem substituições em dois ou mais dos resíduos de Região Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 e 436, em que a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat. Em particular, duas ou mais substituições selecionadas de: T250Q, M252Y, S254T, T256E, R288D, T307Q, V3O8P, A378V, M428L, N434A, H435K e Y436I, em que a numeração é aquela do índice EU, como em Kabat.

[00119] Numa modalidade específica, um imunoconjugado da pre-

sente invenção possui uma Região Fc de IgG variante que compreende as substituições:

(A) M252Y, S254T e T256E;

(B) M252Y e S254T;

(C) M252Y e T256E;

(D) T250Q e M428L;

(E) T307Q e N434A;

(F) A378V e N434A;

(G) N434A e Y436I;

(H) V308P e N434A; ou

(I) K288D e H435K.

[00120] Numa modalidade preferencial, o imunoconjugado da presente invenção possui uma Região Fc de IgG variante que compreende quaisquer 1, 2 ou 3 das substituições: M252Y, S254T e T256E. A invenção abrange adicionalmente os imunoconjugados que possuem as Regiões Fc variantes que compreendem:

(A) uma ou mais mutações que alteram a função efetora e/ou FcγR; e

(B) uma ou mais mutações que estendem meia-vida sérica.

[00121] Uma quarta sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção compreende as substituições M252Y, S254T e T256E (mostradas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO: 147):**

APELLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00122] Uma quinta sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da pre-

sente invenção compreendem as substituições M252Y, S254T e T256E (mostradas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica, e a substituição S442C (mostrada sublinhada), de modo a permitir que dois domínios CH3 sejam covalentemente ligados entre si por meio de uma ligação dissulfeto ou permitir a conjugação de uma porção química de fármaco. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO: 148):**

APELLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00123] Uma sexta sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção compreende as substituições L234A/L235A (mostradas sublinhadas) que reduzem ou anulam a função efetora e as substituições M252Y, S254T e T256E (mostradas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO: 149):**

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00124] Uma sétima sequência de IgG1 preferencial para os Domínios CH2 e CH3 dos imunoconjugados que contêm Região Fc da presente invenção compreende as substituições L234A/L235A (mostradas sublinhadas) que reduzem ou anulam a função efetora e as substituições M252Y, S254T e T256E (mostradas sublinhadas), de modo a estender a meia-vida sérica e a substituição S442C (mostrada sublinhada), de modo a permitir que dois CH3 sejam covalentemente ligados

um ao outro por meio de uma ligação de dissulfeto ou permitir a conjugação de uma porção química de fármaco. A sequência de aminoácidos de tal molécula é **(SEQ ID NO: 150):**

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

em que, X é uma lisina (K) ou está ausente.

II. ANTICORPOS ANTI-ADAM9 EXEMPLIFICATIVOS

[00125] A invenção fornece anticorpos particulares e fragmentos de ligação a antígeno do mesmo capazes de se ligar especificamente à ADAM9 úteis na geração dos imunoconjugados da invenção.

[00126] Um polipeptídeo de ADAM9 humana representativo (Sequência NCBI NP_003807, incluindo uma sequência-sinal de 28 resíduos de aminoácido, mostrada sublinhada) tem a sequência de aminoácidos **(SEQ ID NO:5):**

MGSGARFPSG TLRVRWLLLL GLVGPVLGAA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR
LTRERREAPR PYSKQVSYVI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
GTLITDHPNI QNHCHYRGYV EGVHNSSIAL SDCFGLRGLL HLENASYGIE
PLQNSSHFEH IIYRMDDVYK EPLKCGVSNK DIEKETAKDE EEEPPSMTQL
LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIVGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGQITVET FASIVAHELG
HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTLNKGGN
CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDC GTPKECELDP CCEGSTCKLK
SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ
NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGAGKICR NFQCVDASVL NYDCDVQKKC
HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRSYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
GSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFAVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
GNLIPARPAP APPLYSSLT

[00127] Dos 819 resíduos de aminoácido de ADAM9 **(SEQ ID NO:5),** os resíduos 1 a 28 são uma sequência-sinal, os resíduos 29 a 697 são o Domí-

nio Extracelular, os resíduos 698 a 718 são o Domínio Transmembranar e os resíduos 719 a 819 são o Domínio Intracelular. Três domínios estruturais estão localizados no Domínio Extracelular: uma Reprolisina (M12B) Domínio de Família de Metaloprotease de Zinco (aproximadamente nos resíduos 212 a 406); um Domínio de Desintegrina (aproximadamente nos resíduos 423 a 497); e um Domínio tipo EGF (aproximadamente nos resíduos 644 a 697). Várias modificações pós-tradução e isoformas foram identificadas e a proteína é proteoliticamente clivada na rede trans-Golgi antes de alcançar a membrana plasmática para gerar uma proteína madura. A remoção do pró-domínio ocorre por meio de clivagem em dois sítios diferentes. A mesma foi processada mais provavelmente por uma pró-proteína convertase, como furina, no limite entre o pró-domínio e o domínio catalítico (Arg-205/Ala-206). Um sítio de pró-proteína convertase de clivagem a montante adicional (Arg-56/Glu-57) tem uma função importante na ativação de ADAM9.

[00128] Um polipeptídeo de ADAM9 de macaco cynomolgus representativo (Sequência NCBI XM_005563126.2, incluindo uma possível sequência-sinal de 28 resíduos de aminoácido, mostrada sublinhada) tem a sequência de aminoácidos **(SEQ ID NO:6):**

MGSGVGSPSG TLRVRWLLLL CLVGPVLGAA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR
LTRERREAPR PYSKQVSYLI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
GTVITDHPNI QNHCHFRGYV EGVYNSSVAL SNCFGLRGLL HLENASYGIE
PLQNSSHFEH IIYRMDDVHK EPLKCGVSNK DIEKETTKDE EEEPPSMTQL
LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIAGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGHITVET FASIVAHELG
HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTLNKGGN
CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDC GTPKECELDP CCEGSTCKLK
SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ
NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGADKICR NFQCVDASVL NYDCDIQKKC
HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRRYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
VSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFPVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
GNLIPARPAP APPLYSSLT

[00129] O Domínio de Metaloprotease de Zinco de Família Reprolisi-

na (M12B) da proteína está aproximadamente nos resíduos 212 a 406); o Domínio de Desintegrina da proteína está aproximadamente nos resíduos 423 a 497.

[00130] Em certas modalidades, os anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos de ligação a ADAM9 do mesmo da invenção são caracterizados por quaisquer um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou nove dos seguintes critérios:

(1) a capacidade de se ligar imunoespecificamente à ADAM9 humana conforme expressa de modo endógeno na superfície de uma célula de câncer;

(2) se ligar especificamente à ADAM9 humana e de primata não humano (por exemplo, ADAM9 de macaco cynomolgus) com uma afinidade de ligação similar;

(3) se ligar especificamente à ADAM9 humana com uma constante de ligação de equilíbrio (K_D) de 4 nM ou menos;

(4) se ligar especificamente à ADAM9 de primata não humano com uma constante de ligação de equilíbrio (K_D) de 4 nM ou menos

(5) se ligar especificamente à ADAM9 humana com uma taxa de associação (ka) de 5 x 10^5 M^{-1} min^{-1} ou mais;

(6) se ligar especificamente à ADAM9 de primata não humano com uma taxa de associação (ka) de 1 x 10^6 M^{-1} min^{-1} ou mais;

(7) se ligar especificamente à ADAM9 humana com uma taxa de dissociação (kd) de 1 x 10^{-3} min^{-1} ou menos;

(8) se ligar especificamente à ADAM9 de primata não humano com uma taxa de dissociação (kd) de 9 x 10^{-4} min^{-1} ou menos.

(9) otimizados para ter intensificação de pelo menos 100 vezes (por exemplo, intensificação de pelo menos 100 vezes, pelo menos 150 vezes, pelo menos 200 vezes, pelo menos 250 vezes, pelo menos 300 vezes, pelo menos 350 vezes, pelo menos 400 vezes, pelo menos 450 vezes, pelo menos 500 vezes, pelo menos 550 vezes, ou

pelo menos 600 vezes) na afinidade de ligação (por exemplo, conforme medido por análise BIACORE®) à cyno ADAM9 e retém alta afinidade de ligação à ADAM9 humana (por exemplo, análise BIACORE®) em comparação com o anticorpo parental quimérico ou murino.

[00131] Conforme descrito no presente documento, as constantes de ligação de um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo podem ser determinadas com o uso de ressonância de plásmon de superfície, por exemplo, por meio de uma análise BIACORE®. Os dados de ressonância de plásmon de superfície podem ser ajustados a um modelo de ligação Langmuir 1:1 (ka kd simultâneos) e uma constante de ligação de equilíbrio K_D calculada a partir da razão de constantes de taxa kd/ka. Tais constantes de ligação podem ser determinadas para um anticorpo anti-ADAM9 monovalente ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo (por exemplo, uma molécula que compreende um sítio de ligação ao epítopo de ADAM9), um anticorpo anti-ADAM9 bivalente ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo (por exemplo, uma molécula que compreende dois sítios de ligação ao epítopo de ADAM9), ou anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos de ligação a ADAM9 do mesmo que tem valência mais alta (por exemplo, uma molécula que compreende três, quatro ou mais sítios de ligação ao epítopo de ADAM9).

[00132] A presente invenção abrange particularmente imunoconjugados que possuem um anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) anti-ADAM9 e um Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) anti-ADAM9 que se liga imunoespecificamente a um epítopo de um polipeptídeo de ADAM9 humana. A menos que declarado de outro modo, todos os tais anticorpos anti-ADAM9 e fragmento de ligação a ADAM9 dos mesmos são capazes de se ligar imunoespecificamente à ADAM9 humana. Conforme usado no presente documento,

tais Domínios Variáveis de ADAM9 são denominados **"anti-ADAM9-VL"** e **"anti-ADAM9-VH",** respectivamente.

A. ANTICORPOS DE ADAM9 ANTI-HUMANA MURINA

[00133] Um anticorpo anti-ADAM9 murino que bloqueia a atividade de processamento de proteína-alvo de ADAM9 é internalizado e que tem atividade antitumoral foi identificado (consultar, por exemplo, Patente US nº 8.361.475). Este anticorpo, designado nas Patentes US nº 7.674.619 e 8.361.475 como um anticorpo "anti-KID24" produzido por clone de hibridoma ATCC PTA-5174, é designado no presente documento como **"MAB-A".** MAB-A exibe ligação preferencial forte a tumores sobre tecidos normais (consultar, **Figuras 7A a 7C).** MAB-A exibiu pouca ou nenhuma coloração através de um grande painel de tipos de células normais **(Tabela 2).**

Tabela 2	
Tecido	**MAB-A (1,25 µg/ml)**
Adrenal	Negativo
Bexiga	Negativo
Tecido	MAB-A **(1,25 µg/ml)**
Medula Óssea	Negativo
Mama	Negativo
Cerebelo	Negativo
Cérebro	ND
Colo do útero	Negativo
Cólon	Negativo
Esôfago	Tecido Liso +/- a 1+ (gr c) <5%
Trompa uterina	Negativo
Coração	Negativo
Rim	Negativo
Fígado	Negativo
Pulmão	Negativo

Linfonodo	Negativo
Ovário	Negativo
Pâncreas	Muito raro (possivelmente acinar) 1+ (c)
Paratireoide	Células parenquimais de epitélio 1+ (gr c), 1% Células (favorecem células principais) 2+ (m,c)5% 1+ (m,c) 10% de apical primariamente
Pituitário	Células de lóbulo posterior (possivelmente células neurais e/ou pituicitos 1+ (c>m) <5%
Placenta	Células de revestimento vascular em placa coriônica 1+ (gr c>m) Células mesenquimais de placa coriônica 1-2+ (gr c),5%
Próstata	Epitélio glandular 2+ (gr c)5% e 1+ (gr c) 5%
Retina + Corpo Ciliar	Favorecem negativo (camada de epi pigmentada 3-4+ (gr c) devido ao pigmento não colorido)
Glândula Submandibular	Epi ductal +/- (c) 10%
Músculo Esquelético	Negativo
Pele	Negativo
Intestino Delgado	Negativo
Medula Espinhal	Neurópilo 1+ (gr c) <1%
Baço	Negativo
Tecido	**MAB-A (1,25 µg/ml)**
Estômago	Negativo
Testículo	Túbulo seminífero 1+ (gr c) <5% Células intersticiais (possivelmente células de Leydig) 2-3+ (gr c) <5% e 1+ (gr c) 10%
Tireoide	Negativo
Amídala	Células endo 2-3+ (c,m) <5% e 1+ (m,c) 15%
Ureter	Epitélio transicional 1+ (m,c) <5% e 1+ (m,c) 5%; Células endo 1+ (c) <5%
Útero	Negativo
Pélete de células A498	2 a 3+ (m,c), 50%, 1+ (m,c) 45%

[00134] Conforme mostrado na Figura **2,** MAB-A se liga à ADAM9 humana com alta afinidade, mas liga ADAM9 de primata não humano

(por exemplo, macaco cynomolgus) a um ponto menor.

[00135] As sequências de aminoácidos dos Domínios VL e VH de MAB-A são fornecidas abaixo. Os Domínios VH e VL de MAB-A foram humanizados e as CDRs otimizadas para melhorar a afinidade e/ou remover as responsabilidades potenciais de aminoácido. A CDR_H3 foi adicionalmente otimizada para intensificar a ligação à ADAM9 de primata não humano enquanto mantém sua alta afinidade para ADAM9 humana.

[00136] Os imunoconjugados preferenciais da presente invenção que compreendem 1, 2 ou todas as 3 das CDR_Hs de um Domínio VH e/ou 1, 2 ou todas as 3 das CDR_Ls do Domínio VL de uma variante otimizada de MAB-A, e possuem preferencial e adicionalmente as regiões de framework humanizadas **("FRs")** dos Domínios VH e/ou VL de MAB-A humanizado. Outros imunoconjugados preferenciais da presente invenção possuem os Domínios VH e/ou VL inteiros de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A.

[00137] A invenção se refere particularmente a imunoconjugados que compreendem:

(A) (1) as três CDR_Hs do Domínio VH de MAB-A; e

(2) as quatro FRs do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(B) (1) as três CDR_Ls do Domínio VL de MAB-A; e

(2) as quatro FRs do Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(C) as três CDR_Hs do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e as três CDR_Ls do Domínio VL de MAB-A; ou

(D) as três CDR_Hs do Domínio VH de MAB-A; e as três CDR_Ls do Domínio VL de um MAB-A variante otimizado; ou

(E) as três CDR_Hs do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e as três CDR_Ls do Domínio VL de um MAB-A otimiza-

do; ou

(F) (1) os três CDR_Hs do Domínio VH de uma variante otimizada de MAB-A; e

(2) as quatro FRs do Domínio VH de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(G) (1) as três CDR_Ls do Domínio VL de uma variante otimizada de MAB-A; e

(2) as quatro FRs do Domínio VL de uma variante humanizada de MAB-A; ou

(H) (1) o Domínio VH de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A; e

(2) o Domínio VL de uma variante humanizada/otimizada de MAB-A. Anticorpo Murino "MAB-A"

[00138] A sequência de aminoácidos do Domínio VH do anticorpo MAB-A anti-ADAM9 murino é **SEQ ID NO:7** (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT **SYWMH**WVKQR PGQGLEWIG**E**
IIPINGHTNY NEKFKSKATL TLDKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF DYWGQGTTLT VSS

[00139] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H1 de MAB-A é (**SEQ ID NO:8)**: SYWMH.

[00140] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H2 de MAB-A é (**SEQ ID NO:9)**: EIIPINGHTNYNEKFKS.

[00141] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_H3 de MAB-A é (**SEQ ID NO:10)**: GGYYYYGSRDYFDY.

[00142] A sequência de aminoácidos do Domínio VL do anticorpo MAB-A anti-ADAM9 murino é **SEQ ID NO:11** (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**KASQSVD YDGDSYMN**WY QQIPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YC**QQSHEDPF**
TFGGGTKLEI K

[00143] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L1 de MAB-A é (**SEQ ID NO:12)**: KASQSVDYDGDSYMN.

[00144] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L2 de MAB-A é (**SEQ ID NO:13)**: AASDLES.

[00145] A sequência de aminoácidos do Domínio de CDR_L3 de MAB-A é (**SEQ ID NO:14)**: QQSHEDPFT.

B. DOMÍNIOS VH E VL ANTI-ADAM9 HUMANIZADOS/OTIMIZADOS EXEMPLIFICATIVOS

1. OS DOMÍNIOS DE MAB-A VH VARIANTES

[00146] As sequências de aminoácidos de certos Domínios de MAB-A VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferenciais são variantes do Domínio VH de MAB-A de ADAM9 (**SEQ ID NO:7**) e são representados pela **SEQ ID NO:15** (os resíduos de CDR_H são mostrados sublinhados):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWX$_1$H**WVRQA
PGKGLEWVG**E** **IIPIX$_2$GHTNY** **NEX$_3$FX$_4$X$_5$**RFTI SLDNSKNTLY
LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG** **YYYYX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$** **DY**WGQGTTVT
VSS

em que: X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 e X_6 são, independentemente, selecionados,

em que: X_1 é M ou I; X_2 é N ou F;

X_3 é K ou R; X_4 é K ou Q;

X_5 é S ou G, e X_6 é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D;

em que: X_7, X_8, X_9, X_{10} e X_{11} são selecionados de modo que:

(A) quando X_6 é P:
X_7 seja K ou R;
X_8 seja F ou M;
X_9 seja G;
X_{10} seja W ou F; e
X_{11} seja M, L ou K;

(B) quando X_6 é F, Y ou W:
X_7 seja N ou H;
X_8 seja S ou K;
X_9 seja G ou A;
X_{10} seja T ou V; e
X_{11} seja M, L ou K;

(C) quando X_6 é I, L ou V:
X_7 seja G;
X_8 seja K;

(D) quando X_6 é T:
X_7 seja G;
X_8 seja K, M ou N;

X_9 seja G ou A;	**X_9** seja G;
X_{10} seja V; e	**X_{10}** seja V ou T; e
X_{11} seja M, L ou K;	**X_{11}** seja L ou M;
(E) quando **X_6** é G: e	(F) quando **X_6** é D:
X_7 seja G;	**X_7** seja S;
X_8 seja S;	**X_8** seja N;
X_9 seja G;	**X_9** seja A;
X_{10} seja V; e	**X_{10}** seja V; e
X_{11} seja L;	**X_{11}** seja L.

[00147] As sequências de aminoácidos de um Domínio VH de MAB-A anti-ADAM9 humanizado preferencial: hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:16**) e dos certos Domínios de MAB-A VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferenciais:

hMAB-A VH(2) (**SEQ ID NO:17**) hMAB-A VH(2D) (**SEQ ID NO:23**)
hMAB-A VH(3) (**SEQ ID NO:18**) hMAB-A VH(2E) (**SEQ ID NO:24**)
hMAB-A VH(4) (**SEQ ID NO:19**) hMAB-A VH(2F) (**SEQ ID NO:25**)
hMAB-A VH(2A) (**SEQ ID NO:20**) hMAB-A VH(2G) (**SEQ ID NO:26**)
hMAB-A VH(2B) (**SEQ ID NO:21**) hMAB-A VH(2H) (**SEQ ID NO:27**)
hMAB-A VH(2C) (**SEQ ID NO:22**) hMAB-A VH(2I) (**SEQ ID NO:28**)
e hMAB-A VH(2J) (**SEQ ID NO:29**)
são apresentados abaixo (resíduos de CDR_H são mostrados em sublinhado único; as diferenças em relação a hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:7**) são mostradas em sublinhado duplo).

hMAB-A VH(1) (**SEQ ID NO:16**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPINGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2) (**SEQ ID NO:17**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(3) (**SEQ ID NO:18**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NERFQGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(4) (**SEQ ID NO:19**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWIH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NERFQGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2A) (**SEQ ID NO:20**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFNSGTL DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2B) (**SEQ ID NO:21**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYIGKGVL DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2C) (**SEQ ID NO:22**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2D) (**SEQ ID NO:23**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYTGKGVL DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2E) (**SEQ ID NO:24**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYDSNAVL DYWGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2F) (**SEQ ID NO:25**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFHSGTL **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2G) (**SEQ ID NO:26**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFNKAVL **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2H) (**SEQ ID NO:27**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGGSGVL **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2I) (**SEQ ID NO:28**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYPRQGFL **DY**WGQGTTVT VSS

hMAB-A VH(2J) (**SEQ ID NO:29**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYYNSGTL **DY**WGQGTTVT VSS

[00148] As sequências de aminoácidos adequadas para as FRs de um Domínio VH anti-ADAM9 de MAB-A humanizado e/ou otimizado são:

Domínio de FR_H1 (**SEQ ID NO:30)**: EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS-CAASGFTFS

Domínio de FR_H2 (**SEQ ID NO:31)**: WVRQAPGKGLEWVG

Domínio de FR_H3 (**SEQ ID NO:32)**: RFTISLDNSKNTLYLQMGSLRAE-DTAVYYCAR

Domínio de FR_H4 (**SEQ ID NO:33)**: WGQGTTVTVSS

[00149] As sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio de CDR_H1 de um Domínio VH anti-ADAM9 incluem:

SEQ ID NO:8: SYWMH

SEQ ID NO:34: SYWIH

[00150] As sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio de CDR_H2 de um Domínio VH anti-ADAM9 incluem:

SEQ ID NO:9: EIIPINGHTNYNEKFKS

SEQ ID NO:35: EIIPIFGHTNYNEKFKS

SEQ ID NO:36: EIIPIFGHTNYNERFQG

[00151] As sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio de CDR_H3 de um Domínio VH anti-ADAM9 incluem:

SEQ ID NO:10: GGYYYYGSRDYFDY

SEQ ID NO:37: GGYYYYFNSGTLDY

SEQ ID NO:38: GGYYYYIGKGVLDY

SEQ ID NO:39: GGYYYYPRFGWLDY

SEQ ID NO:40: GGYYYYTGKGVLDY

SEQ ID NO:41: GGYYYYDSNAVLDY

SEQ ID NO:42: GGYYYYFHSGTLDY

SEQ ID NO:43: GGYYYYFNKAVLDY

SEQ ID NO:44: GGYYYYGGSGVLDY

SEQ ID NO:45: GGYYYYPRQGFLDY

SEQ ID NO:46: GGYYYYYNSGTLDY

[00152] Consequentemente, a presente invenção abrange moléculas de ligação à ADAM9 que têm um domínio VH que compreende:

(1) um Domínio de CDR_H1 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:47: $SYWX_1H$

em que: $\mathbf{X_1}$ é M ou I;

(2) um Domínio de CDR_H2 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:48: $EIIPIX_2GHTNYNEX_3FX_4X_5$

em que: $\mathbf{X_2}$, $\mathbf{X_3}$, $\mathbf{X_4}$ e $\mathbf{X_5}$ são independentemente selecionados, e

em que: **X_2** é N ou F; **X_3** é K ou R;

X_4 é K ou Q; e **X_5** é S ou G.

e

(3) um Domínio de CDR_H3 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:49: $GGYYYYYX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}DY$

em que: **X_6** é P, F, Y, W, I, L, V, T, G ou D, e **X_7**, **X_8**, **X_9**, **X_{10}** e **X_{11}** são selecionados de modo que:

(A) quando **X_6** é P:
X_7 seja K ou R;
X_8 seja F ou M;
X_9 seja G;
X_{10} seja W ou F; e
X_{11} seja M, L ou K;

(B) quando **X_6** é F, Y ou W:
X_7 seja N ou H;
X_8 seja S ou K;
X_9 seja G ou A;
X_{10} seja T ou V; e
X_{11} seja M, L ou K;

(C) quando **X_6** é I, L ou V:
X_7 seja G;
X_8 seja K;
X_9 seja G ou A;
X_{10} seja V; e
X_{11} seja M, L ou K;

(D) quando **X_6** é T:
X_7 seja G;
X_8 seja K, M ou N;
X_9 seja G;
X_{10} seja V ou T; e
X_{11} seja L ou M;

(E) quando **X_6** é G: e
X_7 seja G;
X_8 seja S;
X_9 seja G;
X_{10} seja V; e
X_{11} seja L;

(F) quando **X_6** é D:
X_7 seja S;
X_8 seja N;
X_9 seja A;
X_{10} seja V; e
X_{11} seja L.

[00153] Uma primeira Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2)** (**SEQ ID NO:17**), e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:50**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00154] Uma segunda Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2C)** (**SEQ ID NO:22**), e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:51**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00155] Uma terceira Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A VH (2I) (**SEQ ID NO:28**), e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:52**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00156] Conforme fornecido acima, os Domínios CH2-CH3 da Região Fc podem ser manipulados, por exemplo, para reduzir a função efetora e/ou introduzir um sítio de conjugação e/ou estender a meia-vida sérica. Em certas modalidades, os Domínios CH2-CH3 das Cadeias Pesadas de IgG1 humanizadas/otimizadas exemplificativas da invenção compreendem uma ou mais substituições selecionadas de: L234A, L235A, M252Y, S254T, T256E e S442C.

[00157] Deste modo, uma quarta Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições L234A e L235A nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:78**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:141**)

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00158] Uma quinta Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente a substituição S442C nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:79**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:142**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00159] Uma sexta Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições L234A, L235A e S442C nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:80**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:143**)

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

em que X é uma lisina (K) ou está ausente.

[00160] Uma sétima Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições M252Y, S254T e T256E nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:147**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:151**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que **X** é uma lisina (K) ou está ausente.

[00161] Numa modalidade, a Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições M252Y, S254T e T256E nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:147**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:155**)

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PG

[00162] Uma oitava Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições M252Y, S254T, T256E e S442C nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:148**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:152**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

em que **X** é uma lisina (K) ou está ausente.

[00163] Numa modalidade, a Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições M252Y, S254T, T256E e S442C nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:148**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:156**)

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PG

[00164] Uma nona Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições L234A, L235A, M252Y, S254T e T256E nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:149**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:153**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

em que **X** é uma lisina (K) ou está ausente.

[00165] Uma décima Cadeia Pesada de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A **VH (2I)** (**SEQ ID NO:28**), e compreende adicionalmente as substituições L234A, L235A, M252Y, S254T, T256E e S442C nos Domínios CH2-CH3 da Região Fc (**SEQ ID NO:150**) e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:154**):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

em que **X** é uma lisina (K) ou está ausente.

2. OS DOMÍNIOS DE MAB-A VL VARIANTES

[00166] As sequências de aminoácidos de Domínios de MAB-A VL anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferenciais são variantes do Domínio VL de MAB-A de ADAM9 (**SEQ ID NO:11**) e são representados pela **SEQ ID NO:53** (os resíduos de CDR_L são mostrados sublinhados):

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISCX_{12}ASQSVD	YX_{13}GDSYX_{14}NWY
QQKPGQPPKL	LIYAASDLES	GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS
SLEPEDFATY	YCQQS$X_{15}X_{16}X_{17}$PF	TFGQGTKLEI	K

em que: X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16} e X_{17} são, independentemente, selecionados, e

em que: X_{12} é K ou R; X_{13} é D ou S;

X_{14} é M ou L; X_{15} é H ou Y;

X_{16} é E ou S; e X_{17} é D ou T.

[00167] As sequências de aminoácidos de um Domínio VL anti-ADAM9 humanizado preferencial de MAB-A**:** hMAB-A VL(1) (**SEQ ID NO:54**), e de certos Domínios VL anti-ADAM9 humanizados/otimizados preferenciais de MAB-A: hMAB-A VL(2) (**SEQ ID NO:55**), hMAB-A VL(3) (**SEQ ID NO:56**), e hMAB-A VL(4) (**SEQ ID NO:57**), são apresentadas abaixo (resíduos CDR_L são mostrados em sublinhado único; as diferenças em relação a hMAB-A VL(1) (**SEQ ID NO:54**) são mostradas em sublinhado duplo).

hMAB-A VL(1) (**SEQ ID NO:54**):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**KASQSVD** **YDGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

hMAB-A VL(2) (**SEQ ID NO:55**):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**KASQSVD** **YSGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

hMAB-A VL(3) (**SEQ ID NO:56**):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**RASQSVD** **YSGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

hMAB-A VL(4) (**SEQ ID NO:57**):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**RASQSVD** **YSGDSYLN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSYSTPF**
TFGQGTKLEI K

[00168] Consequentemente, sequências de aminoácidos adequadas para as FRs de um Domínio VL anti-ADAM9 humanizado e/ou otimizado de MAB-A são:

Domínio de FR_L1 (**SEQ ID NO:58**): DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC

Domínio de FR_L2 (**SEQ ID NO:59**): WYQQKPGQPPKLLIY

Domínio de FR_L3 (**SEQ ID NO:60**): GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYC

Domínio de FR_L4 (**SEQ ID NO:61**): FGQGTKLEIK

[00169] As sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio de CDR_L1 de um Domínio VL anti-ADAM9 incluem:

SEQ ID NO:12: KASQSVDYDGDSYMN

SEQ ID NO:62: KASQSVDYSGDSYMN

SEQ ID NO:63: RASQSVDYSGDSYMN

SEQ ID NO:64: RASQSVDYSGDSYLN

[00170] As sequências de aminoácidos alternativas adequadas para o Domínio de CDR_L3 de um Domínio VL anti-ADAM9 incluem:

SEQ ID NO:14: QQSHEDPFT

SEQ ID NO:65: QQSYSTPFT

[00171] Consequentemente, a presente invenção abrange Domínio VL de anticorpo anti-ADAM9 que compreende:

(1) um Domínio de CDR_L1 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:66: X_{12}ASQSVDYX_{13}GDSYX_{14}N

em que: $\mathbf{X_{12}}$, $\mathbf{X_{13}}$, $\mathbf{X_{14}}$ são independentemente selecionados, e

em que: $\mathbf{X_{12}}$ é K ou R; $\mathbf{X_{13}}$ é D ou S; e $\mathbf{X_{14}}$ é M ou L;

(2) um Domínio de CDR_L2 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:13: AASDLES

e

(3) um Domínio de CDR_L3 que tem a sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO:67: $QQSX_{15}X_{16}X_{17}PFT$

em que: $\mathbf{X_{15}}$, $\mathbf{X_{16}}$ e $\mathbf{X_{17}}$ são independentemente selecionados, e

em que: $\mathbf{X_{15}}$ é H ou Y; $\mathbf{X_{16}}$ é E ou S; e $\mathbf{X_{17}}$ é D ou T.

[00172] Uma Cadeia Leve de IgG1 humanizada/otimizada exemplificativa de um derivado/variante de MAB-A contém o Domínio hMAB-A VL (2) (**SEQ ID NO:55**), e tem a sequência de aminoácidos (**SEQ ID NO:68**):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

[00173] A presente invenção contempla expressa e adicionalmente os imunoconjugados que se ligam imunoespecificamente a um epítopo de um polipeptídeo de ADAM9 humana, e que compreendem qualquer uma dentre CDR_H1, CDR_H2, CDR_H3, CDR_L1, CDR_L2 ou CDR_L3 de MAB-A fornecidas acima, e contempla particularmente tais imunoconjugados que compreendem uma dentre a CDR_H1 MAB-A fornecida acima, uma dentre a CDR_H2 de MAB-A fornecida acima, uma dentre a CDR_H3 de MAB-A fornecida acima, uma dentre a CDR_L1 de MAB-A fornecida acima, uma dentre a CDR_L2 de MAB-A fornecida acima e uma dentre a CDR_L3 de MAB-A fornecida acima. A invenção contempla adicionalmente tais imunoconjugados que compreendem adicionalmente qualquer uma dentre as FR_H1, FR_H2, FR_H3 ou FR_H4, FR_L1, FR_L2, FR_L3 ou FR_L4 de MAB-A humanizadas fornecidas acima e contempla particularmente tais imunoconjugados que compreendem FR_H1, FR_H2, FR_H3 e FR_H4, e/ou que compreendem FR_L1, FR_L2, FR_L3, FR_L4 e FR_H1.

[00174] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo inclui

um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 8, 36 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 34, 36 e 10 e SEQ ID NOs: 64, 13, 65, respectivamente

(e) SEQ ID NOs: 8, 35 e 37 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs: 8, 35 e 38 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 8, 35 e 39 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(h) SEQ ID NOs: 8, 35 e 40 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs: 8, 35 e 41 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(j) SEQ ID NOs: 8, 35 e 42 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(k) SEQ ID NOs: 8, 35 e 43 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(l) SEQ ID NOs: 8, 35 e 44 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(m) SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente; e

(n) SEQ ID NOs: 8, 35 e 46 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente.

[00175] Em particular modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo inclui um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2 e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, a domínio de CDR_L2, e a domínio de CDR_L3 que tem as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente.

[00176] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo inclui um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que tem sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou são 100% idênticas às sequências conforme a seguir:

(a) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(b) SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;
(c) SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:56, respectivamente;
(d) SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:57, respectivamente
(e) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(f) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(g) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(h) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(i) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(j) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(k) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(l) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;
(m) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e
(n) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente

[00177] Por "substancialmente idêntico" ou "idêntico" entende-se um polipeptídeo que exibe pelo menos 50% de identidade com uma

sequência de aminoácidos de referência (por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácidos descritas no presente documento). Preferencialmente, tal sequência é pelo menos 60%, mais preferencialmente pelo menos 80% ou pelo menos 85%, e mais preferencialmente pelo menos 90%, pelo menos 95% pelo menos 99%, ou até mesmo 100% idêntica ao nível de aminoácido ou ácido nucleico em relação à sequência usada para comparação.

[00178] A identidade de sequência é tipicamente medida com o uso de software de análise de sequência (por exemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP ou PILEUP/PRETTYBOX). Tal software corresponde sequências idênticas ou similares atribuindo-se graus de homologia a várias substituições, deleções e/ou outras modificações. As substituições conservativas incluem tipicamente as substituições nos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina. Numa abordagem exemplificativa para determinar o grau de identidade, um programa BLAST pode ser usado, com uma pontuação de probabilidade entre e^{-3} e e^{-100} que indica uma sequência aproximadamente relacionada.

[00179] Em modalidades particulares, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo inclui um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que tem sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou são 100% idênticas às sequências da SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

[00180] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado compreende uma sequência de cadeia pesada e uma cadeia leve conforme a seguir:

(a) SEQ ID NO:50 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(b) SEQ ID NO:51 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(c) SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente
(d) SEQ ID NO:141 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(e) SEQ ID NO:142 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(f) SEQ ID NO:143 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(g) SEQ ID NO:151 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(h) SEQ ID NO:152 e SEQ ID NO:68, respectivamente;
(i) SEQ ID NO:153 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e
(j) SEQ ID NO:154 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[00181] Em particular modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:52 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68. Em outras modalidades particulares, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:142 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68. Em outras modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado é manipulado para meia-vida sérica estendida e compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68. Em outras modalidades particulares, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado é manipulado para meia-vida estendida e compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:155 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68. Em outras modalidades particulares, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado é manipulado para meia-vida sérica estendida e para conjugação específica de sítio e compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:152 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68. Em outras modalidades particulares, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado/otimizado é manipulado para meia-vida séri-

ca estendida e para conjugação específica de sítio e compreende uma cadeia pesada que tem a sequência da SEQ ID NO:156 e uma cadeia leve que tem a sequência da SEQ ID NO:68.

[00182] A presente invenção também contempla expressamente os imunoconjugados que se ligam imunoespecificamente a um epítopo de um polipeptídeo de ADAM9 humana, e que compreendem qualquer um dos Domínios VL ou VH de MAB-A anti-ADAM9 humanizados/otimizados fornecidos acima. A presente invenção contempla particularmente tais anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos de ligação a ADAM9 dos mesmos que compreendem qualquer uma das combinações seguintes de Domínios VL ou VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados:

Combinações de hMAB-A **VH /** hMAB-A **VL**	
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(1)

Combinações de hMAB-A **VH /** hMAB-A **VL**	
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(4)

[00183] A presente invenção abrange especificamente os imunoconjugados que compreendem um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizado/otimizado conforme fornecido acima. Em modalidades particulares, os imunoconjugados da presente invenção compreendem (i) um Domínio VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizado/otimizado, conforme fornecido acima, e (ii) uma Região Fc.

[00184] Embora as modificações particulares aos Domínios VH e VL anti-ADAM9 sejam resumidas acima e comparadas nas **Figuras 3A a 3B**, não é necessário modificar todos ou a maioria destes resíduos durante a manipulação de um Domínio VH ou VL anti-ADAM9

humanizado e/ou otimizado da invenção. A presente invenção também abrange variações menores destas sequências VH e VL incluindo, por exemplo, substituições de aminoácido dos resíduos de aminoácido C-terminais e/ou N-terminais que podem ser introduzidos para facilitar a subclonagem.

III. CONJUGADOS DE ANTICORPO-FÁRMACO

DEFINIÇÕES

[00185] O termo "**imunoconjugado**", "**conjugado**" ou "**ADC**", conforme usado no presente documento, se refere a um composto maitansinoide descrito no presente documento que é ligado a ou conjugado com um agente de ligação de célula (por exemplo, um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo descrito no presente documento).

[00186] Um "**ligante**" é qualquer porção química que é capaz de se ligar a um composto maitansinoide descrito no presente documento, a um agente de ligação de célula, como um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo de maneira covalente estável. Os ligantes podem ser suscetíveis a ou serem substancialmente resistentes à clivagem induzida por ácido, clivagem induzida leve, clivagem induzida por peptidase, clivagem induzida por esterase e clivagem de ligação de dissulfeto, sob condições nas quais o composto ou o anticorpo permanecem ativos. Os ligantes adequados são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos lábeis ácidos, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidase e grupos lábeis de esterase. Os ligantes também incluem ligantes carregados, e formas hidrofílicas dos mesmos conforme descrito no presente documento e conhecido na técnica.

[00187] "**Alquila**", conforme usado no presente documento, se refere a um radical de hidrocarboneto monovalente de cadeia linear ou ramificada saturada de um a vinte átomos de carbono. Exemplos de alquila

incluem, mas sem limitação, metila, etila, 1-propila, 2-propila, 1-butila, 2-metil-1-propila, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butila, 2-metil-2-propila, 1-pentila, 2-pentil 3-pentila, 2-metil-2-butila, 3-metil-2-butila, 3-metil-1-butila, 2-metil-1-butila, 1-hexila), 2-hexila, 3-hexila, 2-metil-2-pentila, 3-metil-2-pentila, 4-metil-2-pentila, 3-metil-3-pentila, 2-metil-3-pentila, 2,3-dimetil-2-butila, 3,3-dimetil-2-butila, 1-heptila, 1-octila e semelhantes. Preferencialmente, a alquila tem um a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, a alquila tem um a quatro átomos de carbono.

[00188] O número de átomos de carbono em um grupo pode ser especificado no presente documento pelo prefixo "C_{x-xx}", em que x e xx são números inteiros. Por exemplo, "C_{1-4}alquila" é um grupo alquila que tem de 1 a 4 átomos de carbono.

[00189] O termo "**composto**" ou "**composto citotóxico**" ou "**agente citotóxico**" são usados de modo intercambiável. Os mesmos são destinados a incluir compostos para os quais uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado dos mesmos tenha sido descrita na presente invenção ou uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado das mesmas que tenham sido incorporadas a título de referência. O termo também inclui estereoisômeros, isômeros geométricos, tautômeros, solvatos, metabólitos e sais (por exemplo, sais farmaceuticamente aceitáveis) de um composto de todas as fórmulas descritas na presente invenção. O termo também inclui quaisquer solvatos, hidratos e polimorfos de qualquer um dos supracitados. A declaração específica de "estereoisômeros", "isômeros geométricos", "tautômeros", "solvatos", "metabólitos", "sal", "conjugados", "sal de conjugados", "solvato", "hidrato" ou "polimorfo" em certos aspectos da invenção descritos neste pedido não devem ser interpretados como uma omissão pretendida destas formas em outros aspectos da invenção em que o termo "composto" é usado sem a declaração destas outras formas.

[00190] O termo "**quiral**" se refere a moléculas que têm a proprie-

dade de não sobreponibilidade do parceiro de imagem espelhada, enquanto o termo "aquiral" se refere a moléculas que são sobreponíveis em seu parceiro de imagem espelhada.

[00191] O termo "**estereoisômero**" se refere a compostos que têm constituição e conectividade químicas idênticas, mas orientações diferentes de seus átomos no espaço que não podem ser interconvertidas por rotação em torno de ligações simples.

[00192] "**Diastereômero**" se refere a um estereoisômero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens espelhadas um do outro. Os diastereômeros têm propriedades físicas diferentes, por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, propriedades espectrais e reatividades. As misturas de diastereômeros podem ser separadas sob procedimentos analíticos de alta resolução, como cristalização, eletroforese e cromatografia.

[00193] "**Enantiômeros**" se referem a dois estereoisômeros de um composto que são imagens espelhadas não sobreponíveis um do outro.

[00194] As definições e convenções estereoquímicas usadas no presente documento seguem, em geral, S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill, *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nova Iorque; e Eliel, E. e Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1994. Os compostos da invenção podem conter centros assimétricos ou quirais e, portanto, existem em formas estereoisoméricas diferentes. É entendido que todas as formas estereoisoméricas dos compostos da invenção incluindo, mas sem limitação, diastereômeros, enantiômeros e atropisômeros, assim como misturas dos mesmos, como misturas racêmicas, formam parte da presente invenção. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente ativas, isto é, os mesmos têm a capacidade de girar o plano de luz plana polarizada. Na descrição de um com-

posto opticamente ativo, os prefixos D e L, ou R e S, são usados para denotar a configuração absoluta da molécula em torno de seu centro quiral (ou centros quirais). Os prefixos d e l ou (+) e (-) são usados para designar o sinal de rotação de luz plano polarizada pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levorrotatório. Um composto de prefixo com (+) ou d é dextrorrotatório. Para uma dada estrutura química, estes estereoisômeros são idênticos, exceto por serem imagens espelhadas um do outro. Um estereoisômero específico também pode ser denominado enantiômero, e uma mistura de tais isômeros é frequentemente chamada de mistura enantiomérica. Uma mistura 50:50 de enantiômeros é denominada como uma mistura racêmica ou um racemato que pode ocorrer quando não houve estereosseleção ou estereoespecificidade numa reação ou processo químico. Os termos "mistura racêmica" e "racemato" se referem a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, desprovidas de atividade óptica.

[00195] O termo "**tautômero**" ou "**forma tautomérica**" se referem a isômeros estruturais de energias diferentes que são interconversíveis por meio de uma baixa barreira de energia. Por exemplo, tautômeros protônicos (também conhecidos como tautômeros prototrópicos) incluem interconversões por meio de migração de um próton, como isomerizações de ceto-enol e imina-enamina. Os tautômeros de valência incluem interconversões por reorganização de alguns dos elétrons de ligação.

[00196] O termo "**cátion**" se refere a um íon com carga positiva. O cátion pode ser monovalente (por exemplo, Na^+, K^+, NH_4^+ etc.), bivalente (por exemplo, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) ou multivalente (por exemplo, Al^{3+} etc.). Preferencialmente, o cátion é monovalente.

[00197] A expressão "**sal farmaceuticamente aceitável**", conforme usado no presente documento, se refere a sais orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis de um composto da invenção. Os

sais exemplificativos incluem, mas sem limitação, sais de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bisulfato, 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 "mesilato", etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato, pamoato (isto é, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sais de metal alcalino (por exemplo, sódio e potássio), sais de metal alcalino terroso (por exemplo, magnésio) e sais de amônio. Um sal farmaceuticamente aceitável pode envolver a inclusão de outra molécula, como um íon acetato, um íon succinato ou outro contraíon. O contraíon pode ser qualquer porção química orgânica ou inorgânica que estabiliza a carga no composto parental. Adicionalmente, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter mais do que um átomo carregado em sua estrutura. Os casos em que múltiplos átomos carregados são parte do sal farmaceuticamente aceitável podem ter múltiplos contraíons. Então, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter um ou mais átomos carregados e/ou um ou mais contraíons.

[00198] Se o composto da invenção é uma base, o sal farmaceuticamente aceitável desejável pode ser preparado por qualquer método adequado disponível na técnica, por exemplo, tratamento da base livre com um ácido inorgânico, coo ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido fosfórico e semelhantes, ou com um ácido orgânico, como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malônico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, um ácido piranosidílico, como ácido glucurônico ou ácido galacturônico, um alfa hidroxiácido, como ácido cítrico ou ácido tartárico, um aminoácido, como ácido aspártico ou ácido glutâmico, um ácido aromático, como

ácido benzoico ou ácido cinâmico, um ácido sulfônico, como ácido p-toluenossulfônico ou ácido etanossulfônico, ou semelhantes.

[00199] Se o composto da invenção é um ácido, o sal farmaceuticamente aceitável desejável pode ser preparado por qualquer método adequado, por exemplo, tratamento do ácido livre com uma base inorgânica ou orgânico, como uma amina (primária, secundária ou terciária), um hidróxido de metal alcalino ou hidróxido de metal alcalino terroso ou semelhantes. Exemplos ilustrativos de sais adequados incluem, mas sem limitação, sais orgânicos derivados de aminoácidos, como glicina e arginina, amônia, aminas primárias, secundárias e terciárias, e aminas cíclicas, como piperidina, morfolina e piperazina, e sais inorgânicos derivados de sódio, cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro, cobre, zinco, alumínio e lítio.

[00200] Conforme usado no presente documento, o termo "**solvato**" significa um composto que inclui adicionalmente uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de solvente, como água, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etila, ácido acético e etanolamina diclorometano, 2-propanol ou semelhantes, ligados por forças intermoleculares não covalentes. Solvatos ou hidratos dos compostos são prontamente preparados por adição de pelo menos um equivalente molar de um solvente hidroxílico, como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ou água ao composto para resultar em solvação ou hidratação da porção química imina.

[00201] Um "**metabólito**" ou "**catabólito**" é um produto produzido através do metabolismo ou catabolismo no corpo de um composto especificado, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, ou sal do mesmo. Os metabólitos de um composto, um derivado do mesmo, ou a conjugado do mesmo, podem ser identificados com o uso de técnicas de rotina conhecidas na arte e suas atividades determinadas com o uso de testes, como aqueles descritos no presente documento.

Tais produtos podem ser resultantes, por exemplo, da oxidação, hidroxilação, redução, hidrólise, amidação, desamidação, esterificação, desesterificação, clivagem enzimática e semelhantes, do composto administrado. Consequentemente, a invenção inclui metabólitos de compostos, um derivado dos mesmos, ou um conjugado dos mesmos, da invenção, incluindo compostos, um derivado dos mesmos, ou um conjugado dos mesmos, produzidos por um processo que compreende fazer o contato de um composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, desta invenção com um mamífero por um período de tempo suficiente para render um produto metabólico do mesmo.

[00202] A expressão "**farmaceuticamente aceitável**" indica que a substância ou composição deve ser quimicamente e/ou toxicologicamente compatível, com os outros ingredientes que compreendem uma formulação e/ou o mamífero tratado com a mesma.

[00203] O termo "**grupo de proteção**" ou "**porção química de proteção**" se refere a um substituinte que é comumente usado para bloquear ou proteger uma funcionalidade particular enquanto reage outros grupos funcionais no composto, um derivado dos mesmos, ou um conjugado dos mesmos. Por exemplo, um "grupo de proteção de amina" ou uma "porção química de proteção de amino" é um substituinte ligado a um grupo amino que bloqueia ou protege a funcionalidade de amino no composto. Tais grupos são bem conhecidos na técnica (consultar, por exemplo P. Wuts e T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ) e exemplificados por carbamatos, como derivados de carbamato de metila e etila, FMOC, carbamatos de etila substituídos, carbamatos clivados por eliminação 1,6-β (também denominada "autoimolativa"), ureias, amidas, peptídeos, alquila e arila. Os grupos de proteção de amino adequados incluem acetila, trifluoroacetila, t-butoxicarbonila (BOC), benziloxicarbonila (CBZ) e 9-fluorenilmetilenoxicarbonila (Fmoc). Para uma descri-

ção geral de grupos de proteção e seu uso, consultar P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2007.

[00204] O termo "**aminoácido**" se refere a aminoácidos de ocorrência natural ou aminoácidos de ocorrência não natural. Numa modalidade, o aminoácido é representado por NH_2-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)OH, em que R^{aa} e $R^{aa'}$ são, cada um, independentemente, H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída que tem 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila ou heterociclila ou R^{aa} e o átomo de nitrogênio N-terminal pode formar junto um anel heterocíclico (por exemplo, como em prolina). O termo "**resíduo de aminoácido**" se refere ao resíduo correspondente quando um átomo de hidrogênio é removido da extremidade de amina do aminoácido e/ou o grupo hidroxila é removido da extremidade carbóxi do aminoácido, como -NH-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)-. Quando um aminoácido ou um resíduo de aminoácido é referenciado sem indicar a estereoquímica específica do carbono alfa, o mesmo é destinado a incluir ambos os isômeros L e R. Por exemplo, "Ala" inclui tanto L-alanina quanto R-alanina.

[00205] O termo "**peptídeo**" se refere a cadeias curtas de monômeros de aminoácido ligados por ligações peptídicas (amida). Em algumas modalidades, os peptídeos contêm 2 a 20 resíduos de aminoácido. Em outras modalidades, os peptídeos contêm 2 a 10 resíduos de aminoácido. Ainda em outras modalidades, os peptídeos contêm 2 a 5 resíduos de aminoácido. Conforme usado no presente documento, quando um peptídeo é uma porção de um agente citotóxico ou um ligante descrito no presente documento representado por uma sequência específica de aminoácidos, o peptídeo pode ser conectado ao restante do agente citotóxico ou do ligante em ambas as direções. Por exemplo, um dipeptídeo X1-X2 inclui X1-X2 e X2-X1. De modo similar,

um tripeptídeo X1-X2-X3 inclui X1-X2-X3 e X3-X2-X1 e um tetrapeptídeo X1-X2-X3-X4 inclui X1-X2-X3-X4 e X4-X2-X3-X1. X1, X2, X3 e X4 representam um resíduo de aminoácido. Quando um peptídeo ou um resíduo de peptídeo é denominado sem indicar a estereoquímica de cada aminoácido ou resíduo de aminoácido, o mesmo é destinado a incluir ambos os isômeros L e R. Entretanto, quando a estereoquímica de um ou mais aminoácidos ou resíduos de aminoácido no peptídeo ou resíduo de peptídeo é especificada como isômero D, o outro aminoácido ou resíduo de aminoácido no peptídeo ou peptídeo resíduo sem estereoquímica especificada é destinado a incluir apenas o isômero L natural. Por exemplo, "Ala-Ala-Ala" é destinado a incluir peptídeos ou resíduos de peptídeo, em que cada uma das Ala pode ser o isômero L ou R; enquanto "Ala-D-Ala-Ala" é destinado a incluir L-Ala-D-Ala-L-Ala.

[00206] O termo "**grupo éster reativo**" se refere a um grupo éster que pode reagir prontamente com um grupo amina para formar ligação amida. Os grupos éster reativos exemplificativos incluem, mas sem limitação, ésteres de N-hidroxissuccinimida, ésteres de N-hidroxiftalimida, ésteres de N-hidroxissulfossuccinimida, ésteres de para-nitrofenila, ésteres de dinitrofenila, ésteres de pentafluorofenila e seus derivados, em que os ditos derivados facilitam a formação de ligação de amida. Em certas modalidades, o grupo éster reativo é um grupo N-hidroxissuccinimida ou um éster N-hidroxissulfossuccinimida.

[00207] O termo "**grupo reativo amina**" se refere a um grupo que pode reagir com um grupo amina para formar uma ligação covalente. Os grupos reativos amina exemplificativos incluem, mas sem limitação, grupos éster reativos, haletos de acila, haleto de sulfonila, imidoéster ou grupos tioéster reativos. Em certas modalidades, o grupo reativo amina é um grupo éster reativo. Numa modalidade, o grupo reativo amina é um éster de N-hidroxissuccinimida ou um éster de N-hidroxis-

sulfossuccinimida.

[00208] O termo "**grupo reativo tiol**" se refere a um grupo que pode reagir com um grupo tiol (-SH) para formar uma ligação covalente. Os grupos reativos tiol exemplificativos incluem, mas sem limitação, maleimida, haloacetila, aloacetamida, vinil sulfona, vinil sulfonamida ou vinial piridina. Numa modalidade, o grupo reativo tiol é maleimida.

[00209] Conforme usado na presente invenção e nas reivindicações, as formas singulares "**um**", "**uma**", "**o**" e "**a**" incluem formas plurais, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

[00210] Entende-se que sempre que as modalidades são descritas no presente documento com a linguagem "**que compreende**", modalidades análogas descritas de outro modo em termos de "**que consiste em**" e/ou "**que consiste essencialmente em**" também são fornecidas.

A. IMUNOCONJUGADOS EXEMPLIFICATIVOS

[00211] Os compostos maitansinoides da presente invenção podem ser acoplados ou conjugados diretamente com o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo ou indiretamente, através de um ligante com o uso de técnicas conhecidas na arte para produzir um "imunoconjugado", "conjugado" ou "ADC".

[00212] Numa primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção compreende um anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo descrito no presente documento covalentemente ligado a um composto maitansinode descrito no presente documento através do grupo ε-amino de um ou mais resíduos lisina localizados no anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo ou através do grupo tiol de um ou mais resíduos de cisteína localizados no anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo.

[00213] Numa 1ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I)

descrita acima, em que R^x, R^y, $R^{x'}$ e $R^{y'}$ são todos H; e l e k são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 6; e as variáveis restantes são conforme descrito acima para a fórmula (I).

[00214] Numa 2ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I) descrita acima, em que A é um peptídeo que contém 2 a 5 resíduos de aminoácido; e as variáveis restantes são conforme descrito acima para a fórmula (I) ou na 1ª modalidade específica. Em algumas modalidades, A é um peptídeo clivável por uma protease. Em algumas modalidades, um peptídeo clivável por uma protease expressado em tecido de tumor. Em algumas modalidades, A é um peptídeo que tem um aminoácido que é covalentemente ligado a $–NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ selecionado do grupo que consiste em Ala, Arg, Asn, Asp, Cit, Cys, selino-Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr e Val, cada um, independentemente, como isômero L ou D. Em algumas modalidades, o aminoácido conectado a $–NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ é um aminoácido L.

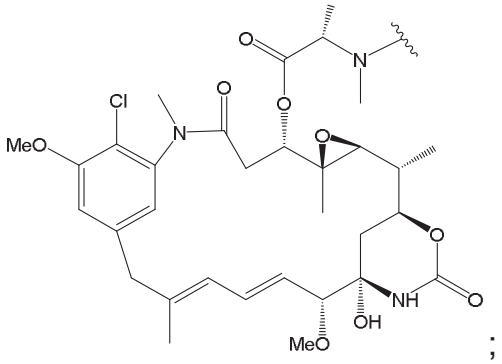
[00215] Numa 3ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I) descrita acima, em que A é selecionado do grupo que consiste em Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, D-Val-Ala, Val-Cit, D-Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Ala, Phe-N9-tosil-Arg, Phe-N9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala-D-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 144), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 145), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 146), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe, Gln-Ala, D-Ala-Pro, e D-Ala-tBu-Gly, em que o primeiro

aminoácido, em cada peptídeo, é conectado ao grupo L2 e o último aminoácido em cada peptídeo é conectado a –NH-CR1R2-S-L1-D; e as variáveis restantes são conforme descrito para a fórmula (I) ou na 1ª modalidade específica.

[00216] Numa 4ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I) descrita acima, em que R^1 e R^2 são ambos H; e as variáveis restantes são conforme descrito para a fórmula (I) ou na 1ª, 2ª ou 3ª modalidade específica.

[00217] Numa 5ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I) descrita acima, em que L_1 é $–(CH_2)_{4-6}$-C(=O)-; e as variáveis restantes são conforme descrito para a fórmula (I) ou na 1ª, 2ª, 3ª ou 4ª modalidade específica.

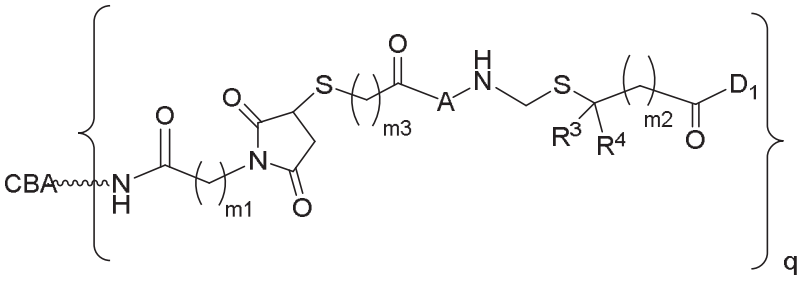
[00218] Numa 6ª modalidade específica da primeira modalidade, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela fórmula (I) descrita acima, em que D é representado pela seguinte fórmula:



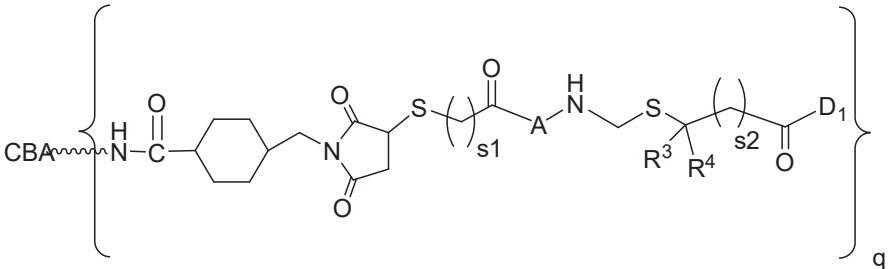
;

e as variáveis restantes são conforme descrito para a fórmula (I) ou na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª ou 5ª modalidade específica.

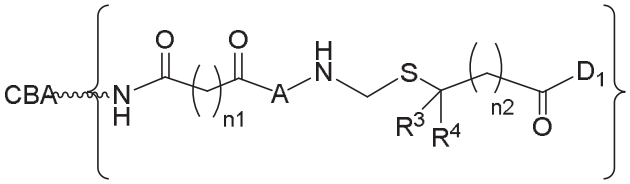
[00219] Numa 7ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



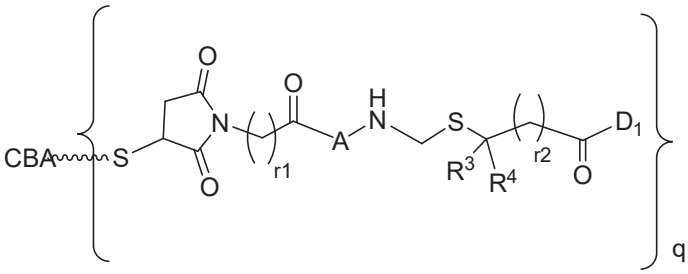
q (Ia);



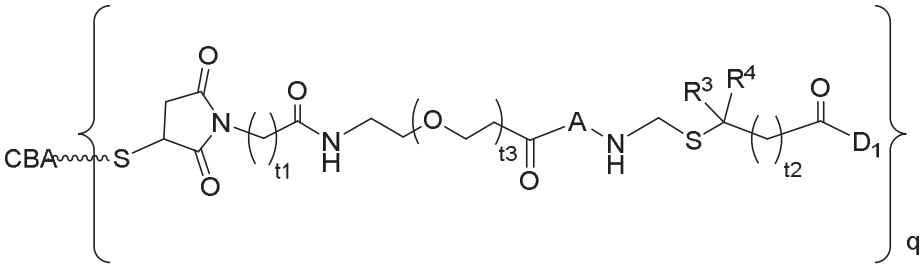
q (Ib);



q (Ic);



q (Id); ou



q (Ie);

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

CBA—N(H)— é o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo conectado ao grupo L_2 através de um grupo Lys amina;

CBA—S— é o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo conectado ao grupo L_2 através de um grupo Cys tiol;

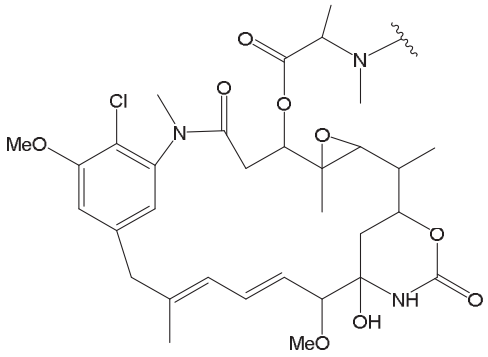
R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me;

m1, m3, n1, r1, s1 e t1 são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 6;

m2, n2, r2, s2 e t2 são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 7;

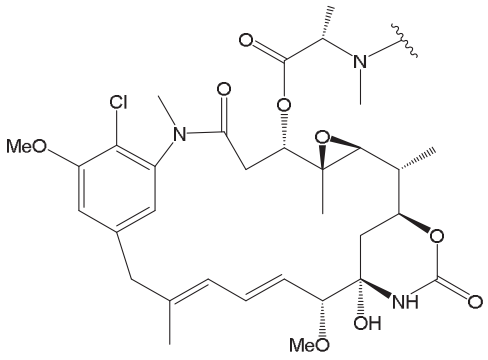
t3 é um número inteiro de 1 a 12;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



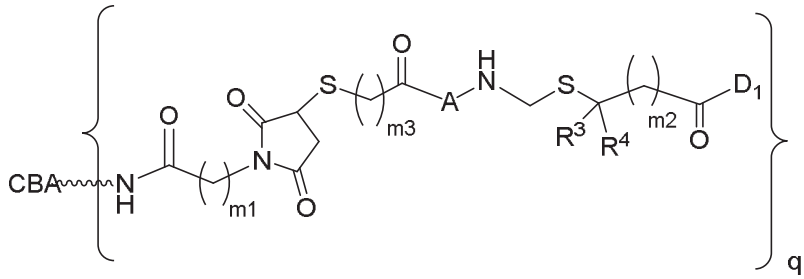
; e

q é um número inteiro de 1 a 20. Numa modalidade mais específica, D_1 é representado pela seguinte fórmula:

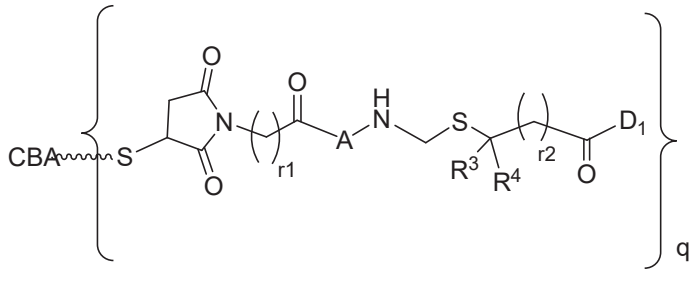


.

[00220] Numa 8ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



(Ia), ou



(Id);

em que:

m1 e m3 são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 4;

m2 é um número inteiro de 2 a 5;

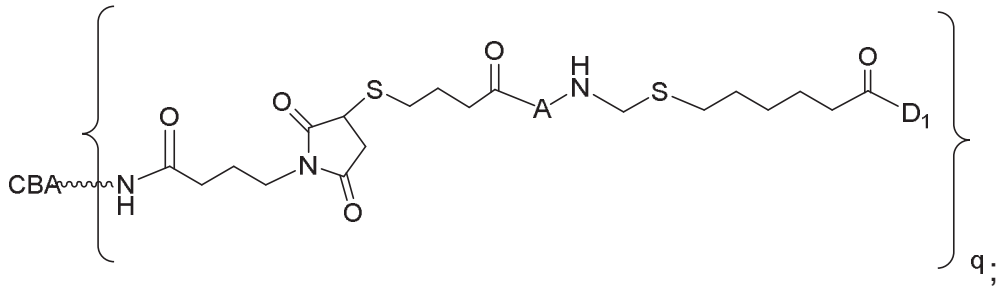
r1 é um número inteiro de 2 a 6;

r2 é um número inteiro de 2 a 5; e

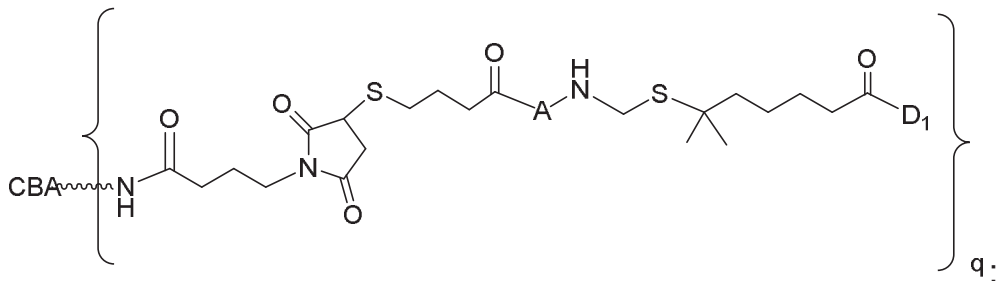
as variáveis restantes são conforme descrito na 7ª modalidade específica.

[00221] Numa 9ª modalidade específica, para os imunoconjugados descritos na 7ª ou 8ª modalidade específica, A é Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, ou D-Ala-tBu-Gly. Numa modalidade mais específica, para os imunoconjugados descritos na 7ª ou 8ª modalidade específica, A é L-Ala-D-Ala-L-Ala.

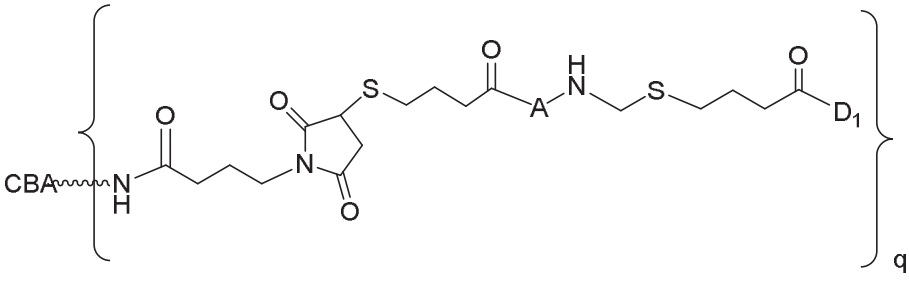
[00222] Numa 10ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



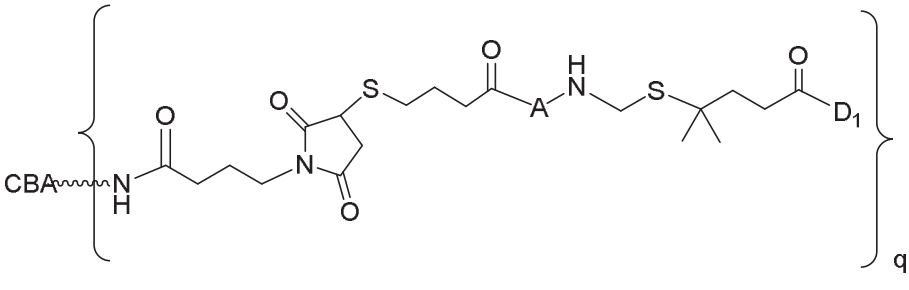
;



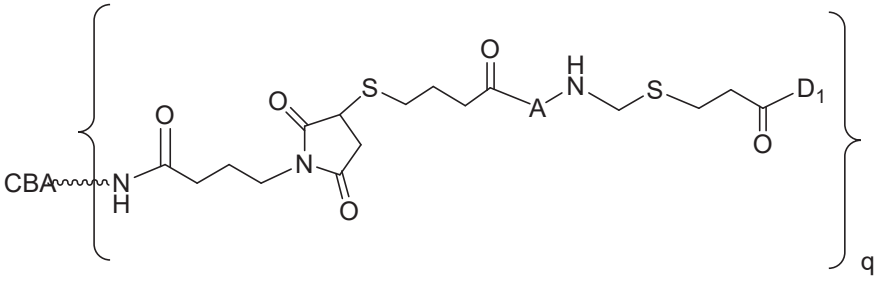
;



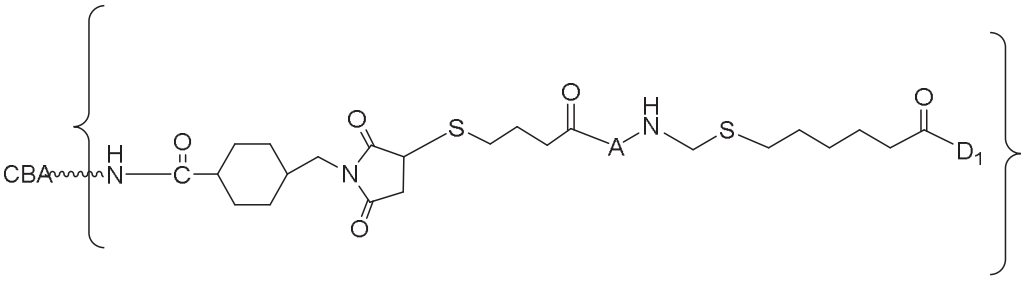
q;



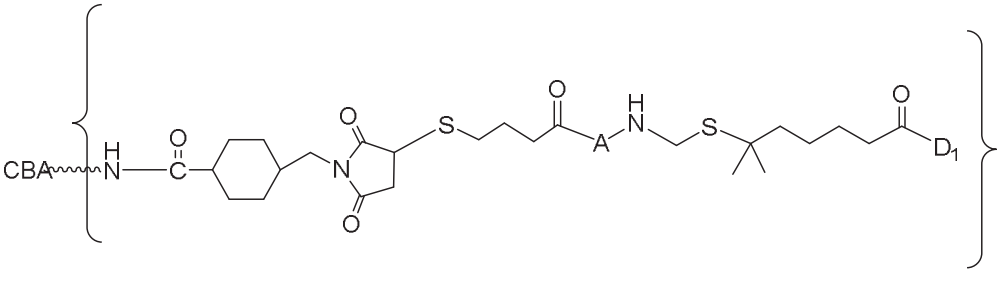
q;



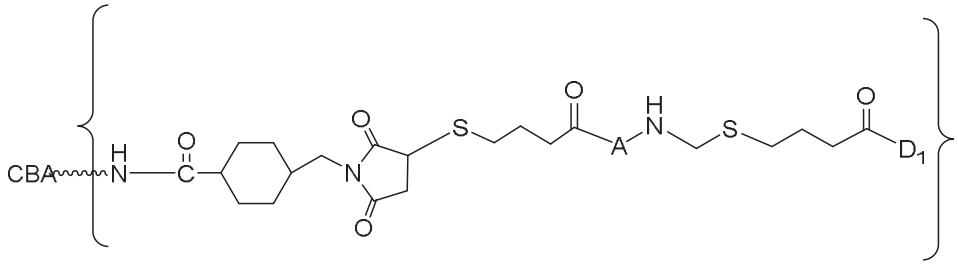
q;



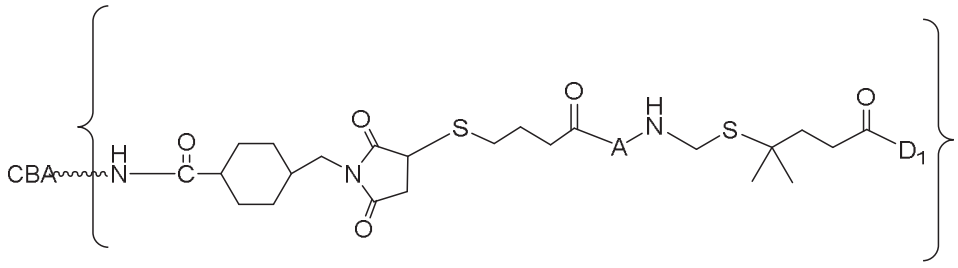
q;



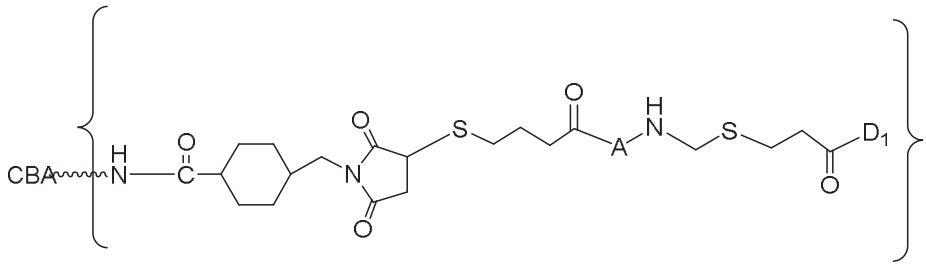
q;



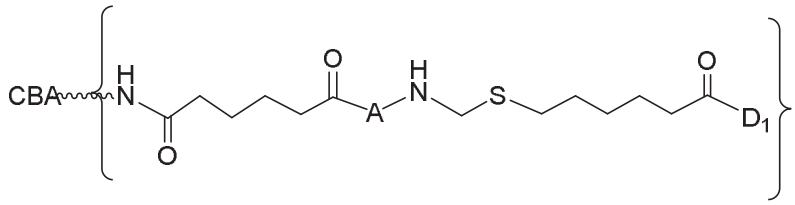
q ;



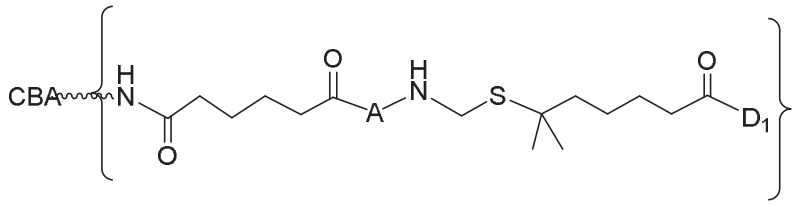
q ;



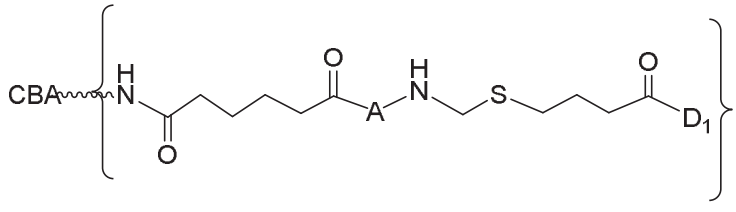
q ;



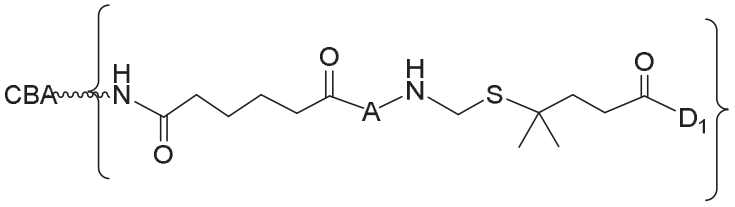
q ;

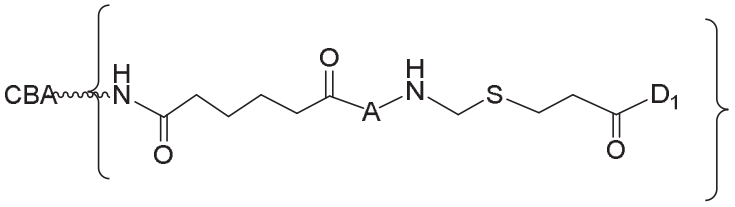


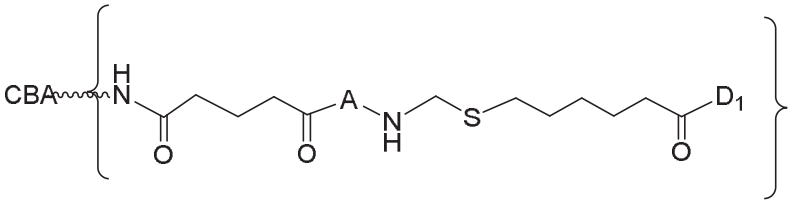
q ;

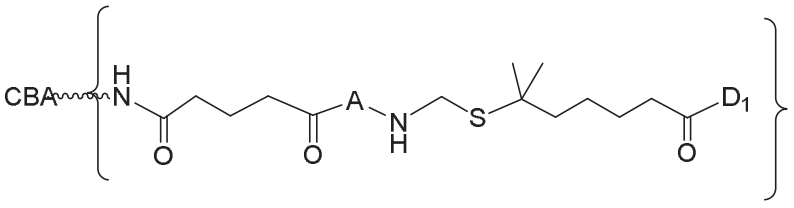


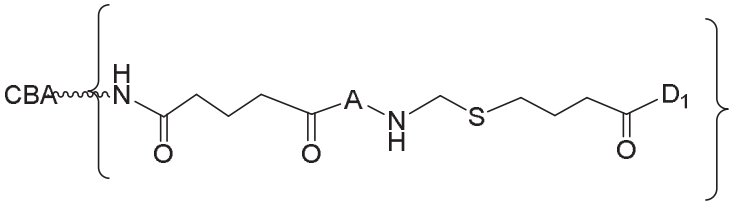
q ;

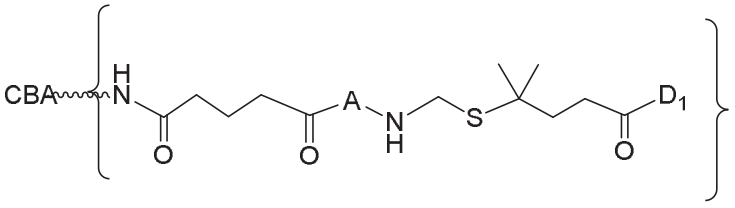

CBA
H
N
O
A
H
N
S
O
D1
q;

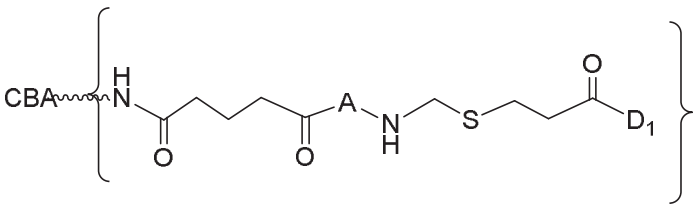

CBA
H
N
O
A
H
N
S
O
D1
q;

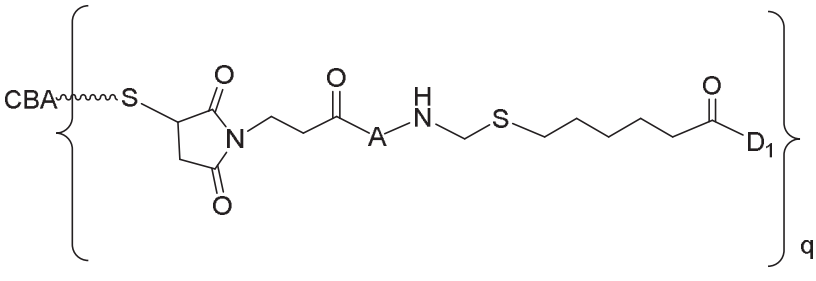

CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;

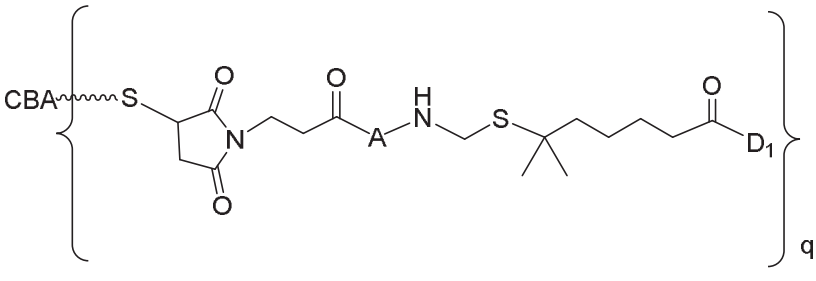

CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;

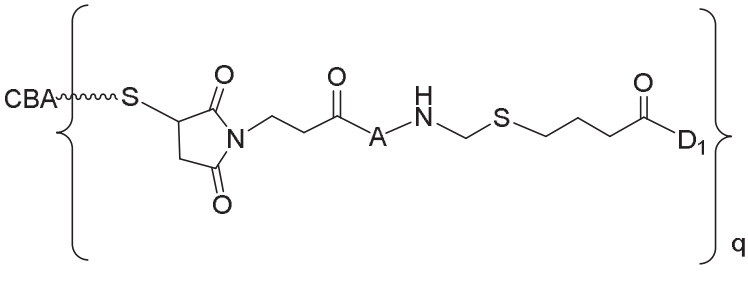

CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;

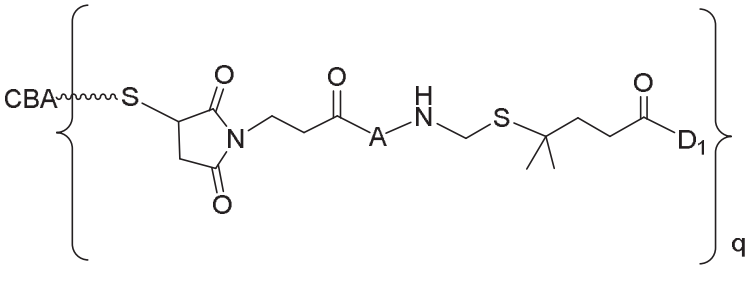

CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;


CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;

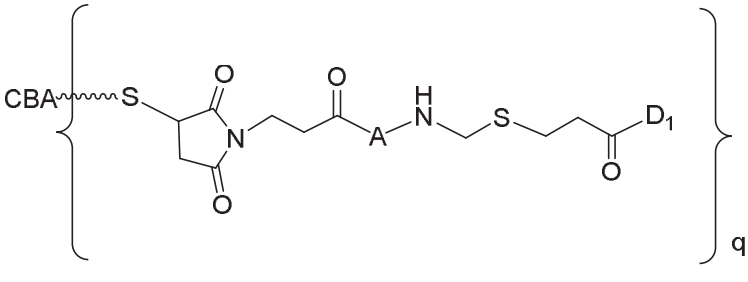


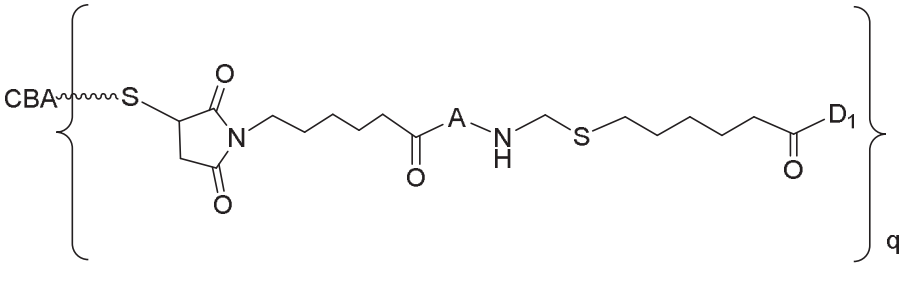


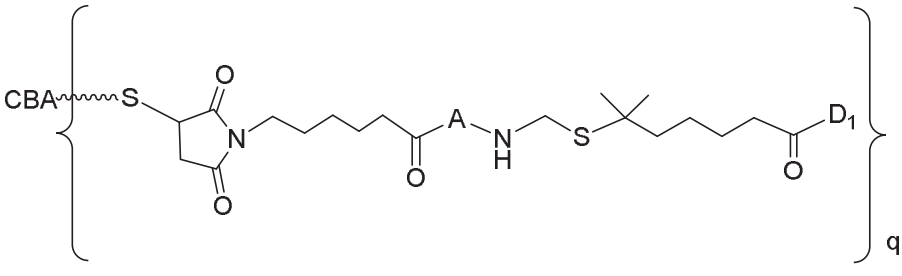


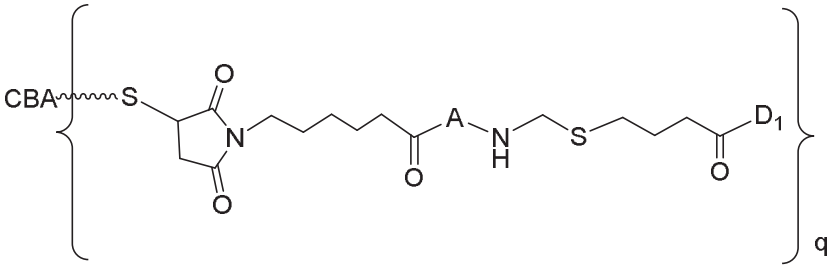


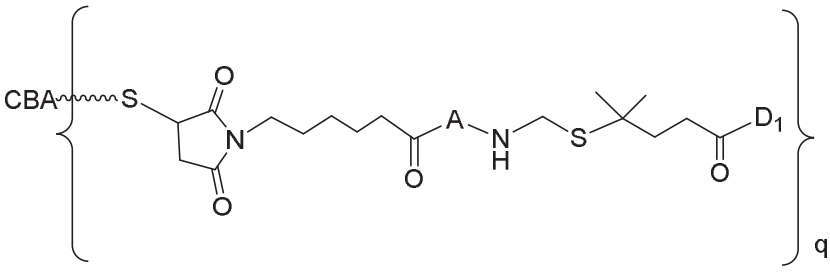
; ou

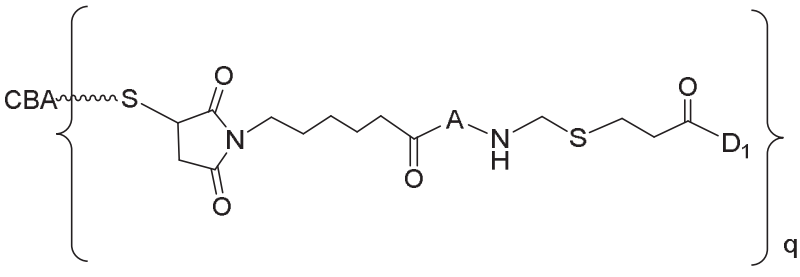


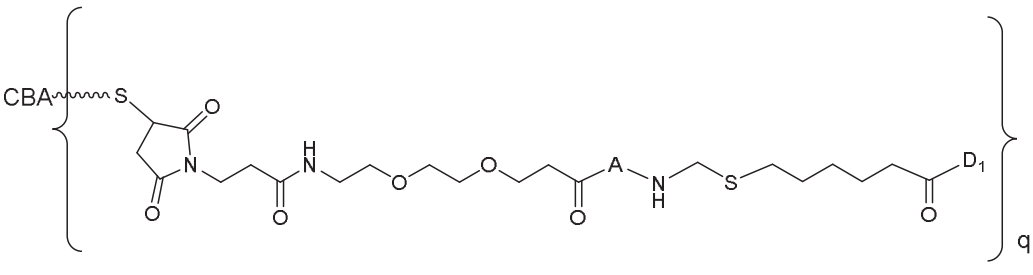


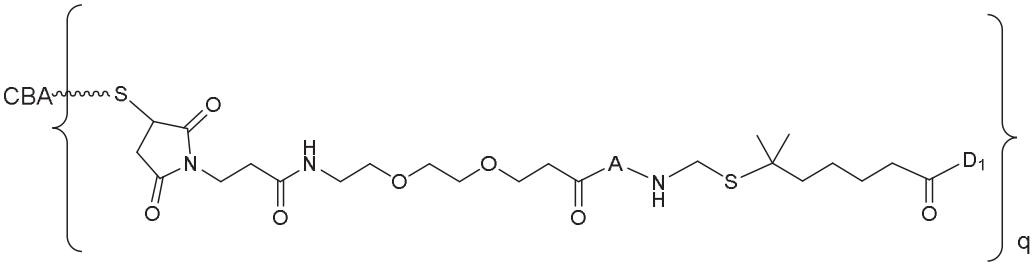


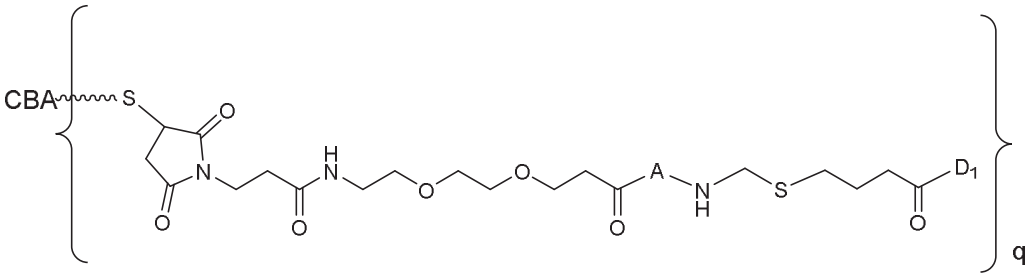


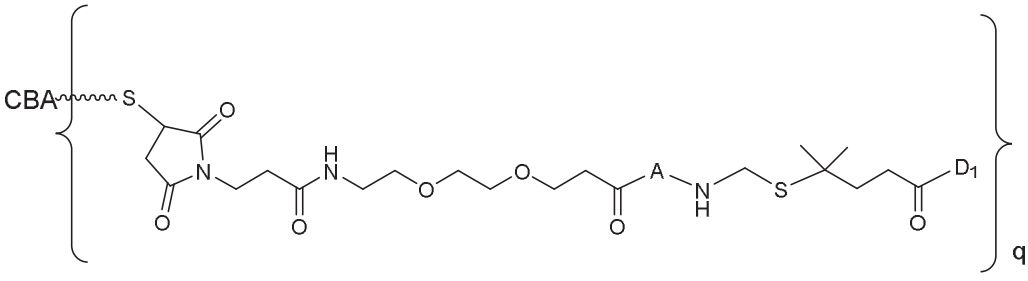


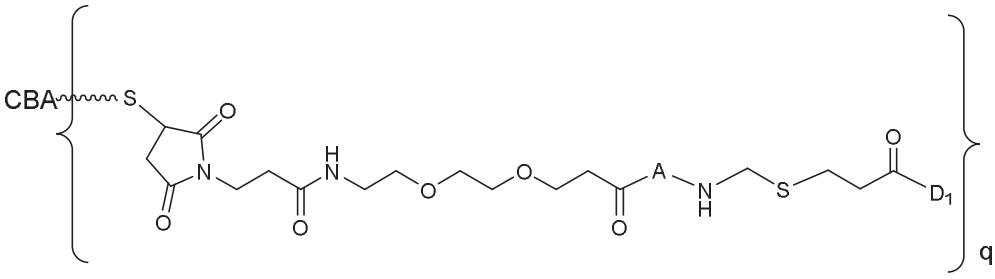


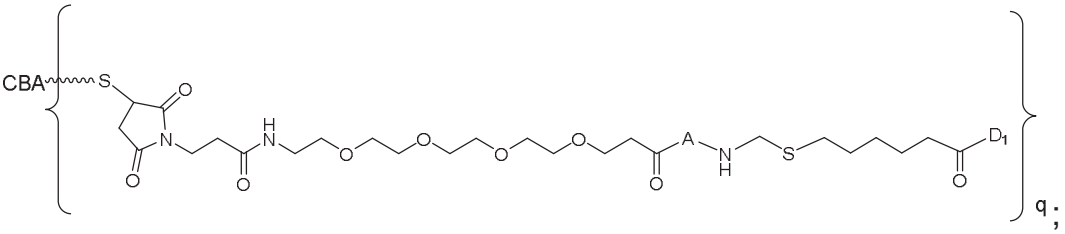


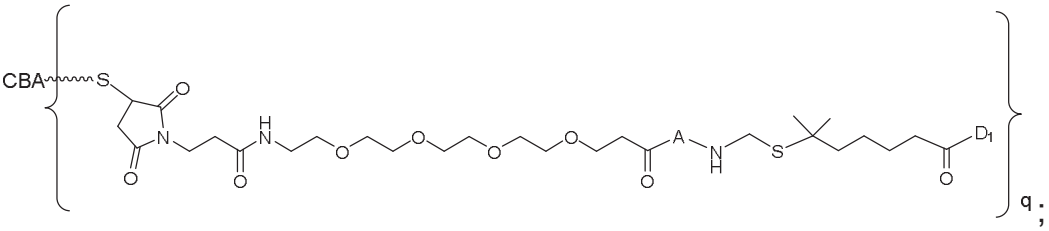


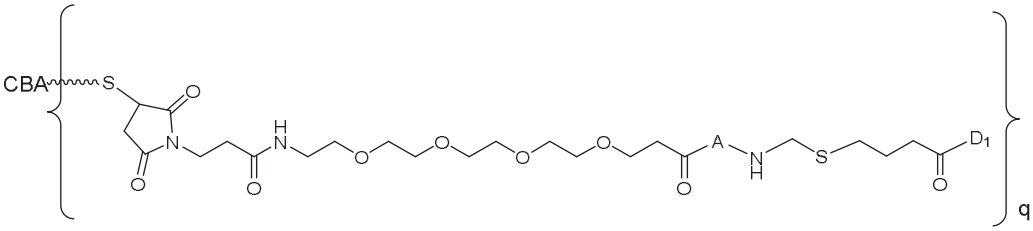

CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;

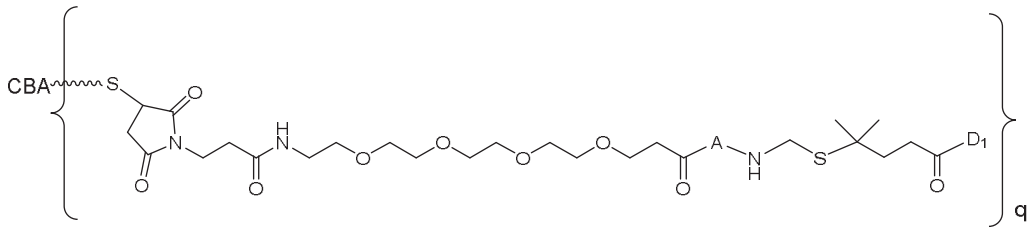

CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;


CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1
q;

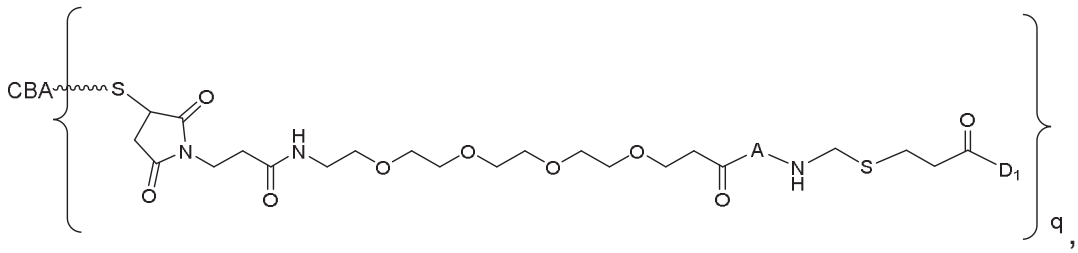

CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
O
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;


CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
O
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;


CBA
S
O
N
O
H
N
O
O
O
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;



; ou

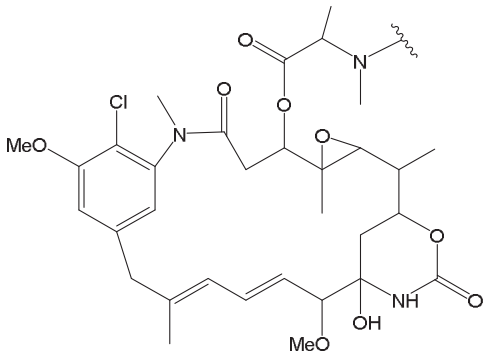


,

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

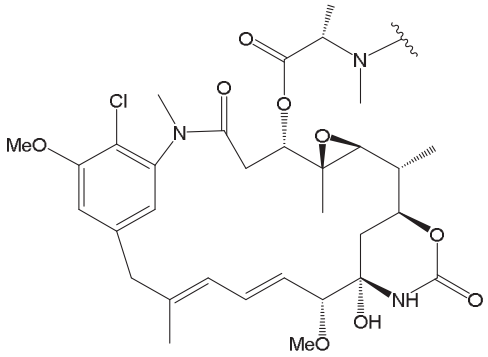
A é Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, ou D-Ala-tBu-Gly, e

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



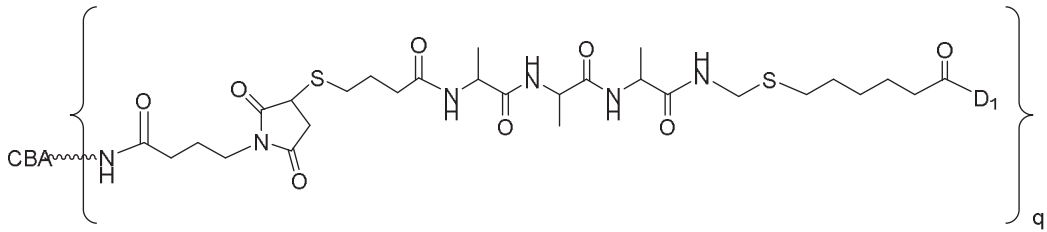
;

e as variáveis restantes são conforme descrito na 7ª, 8ª ou 9ª modalidade específica. Numa modalidade mais específica, A é L-Ala-D-Ala-L-Ala. Numa modalidade mais específica, D_1 é representado pela seguinte fórmula:

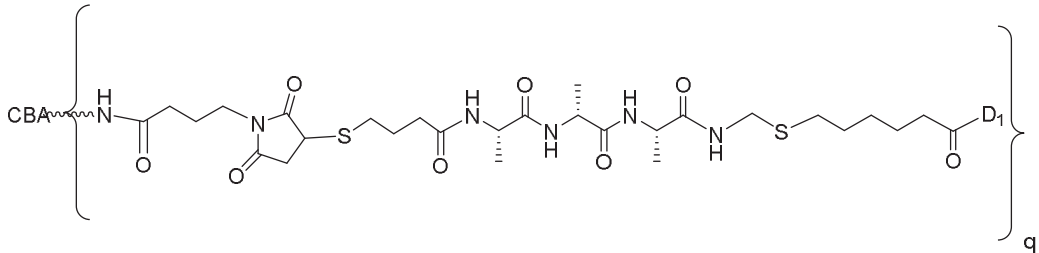


.

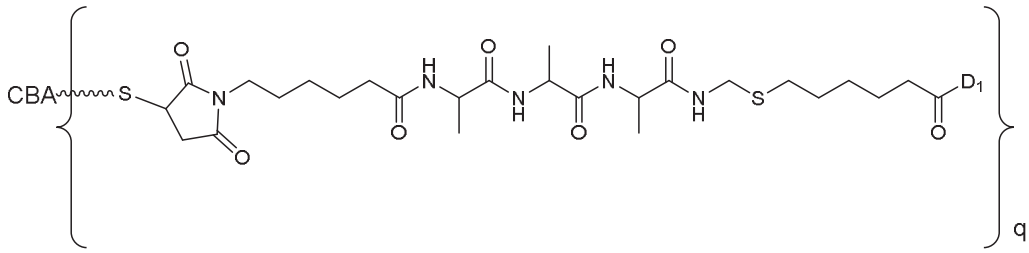
[00223] Numa 11ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



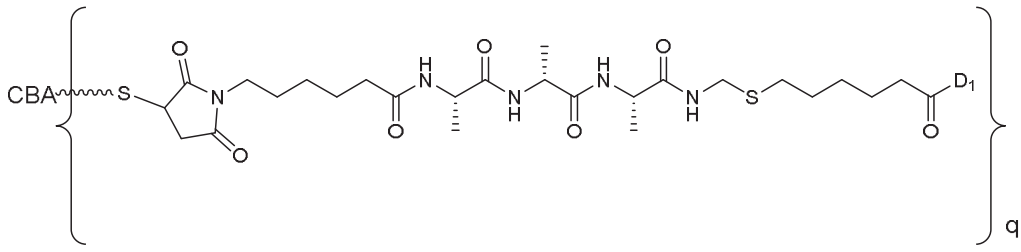
;



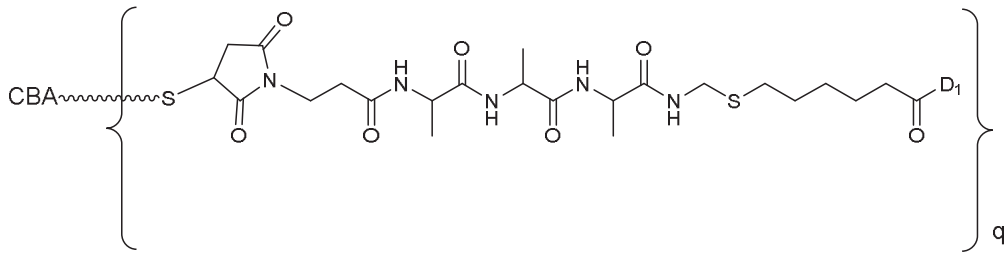
;



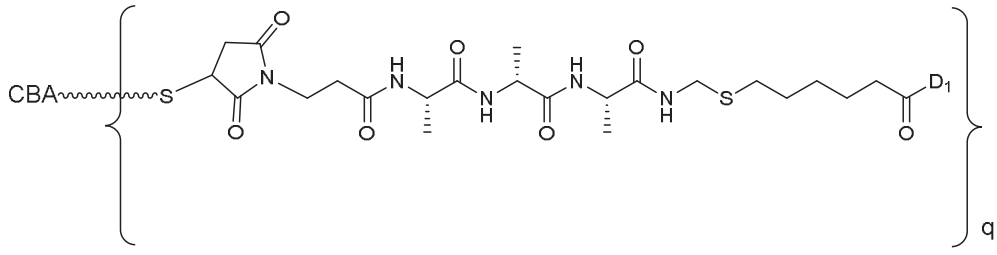
;



;

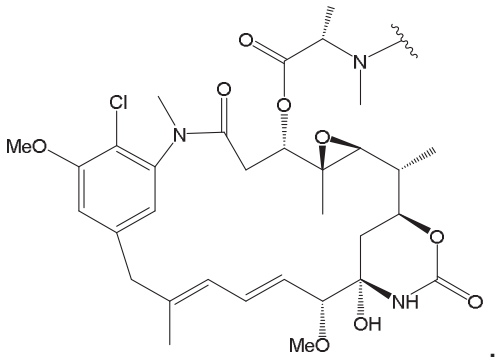


; ou

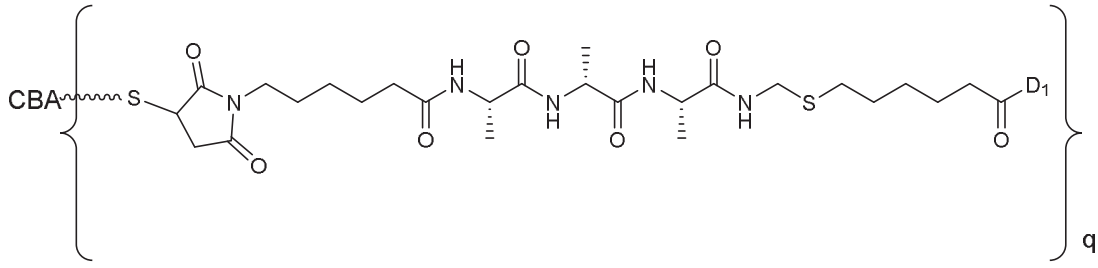


,

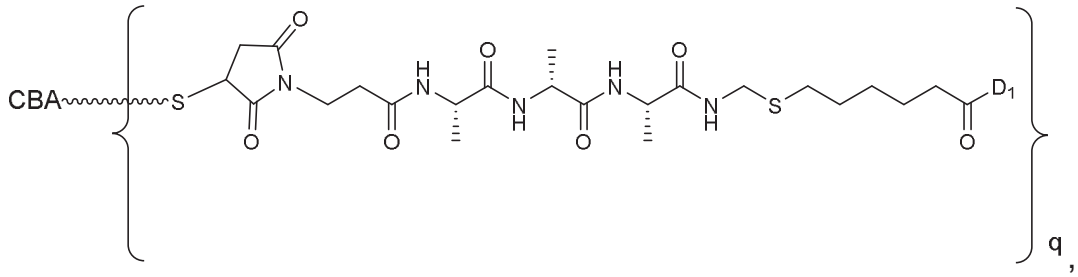
em que D_1 é representado pela seguinte fórmula:



[00224] Numa 12ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



,

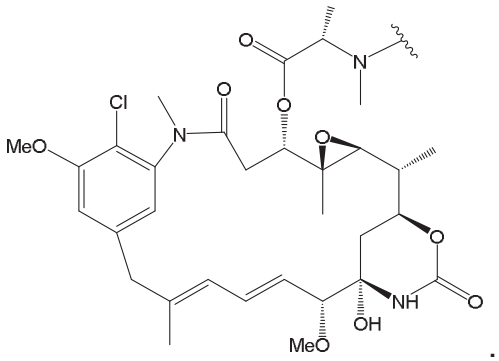


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

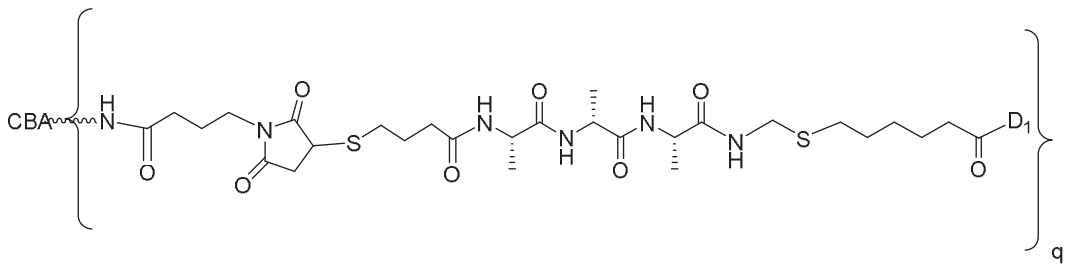
q é 1 ou 2;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



[00225] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências da SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:142 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:152 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO:142 ou SEQ ID NO:152 é lisina. Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO:142 ou SEQ ID NO:152 está ausente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:156 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

[00226] Numa 13ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:

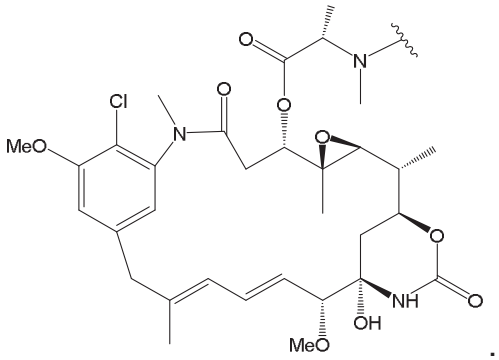


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2, e um domínio de CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio de CDR_L2, e um domínio de CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

q é um número inteiro de 1 ou 10;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:

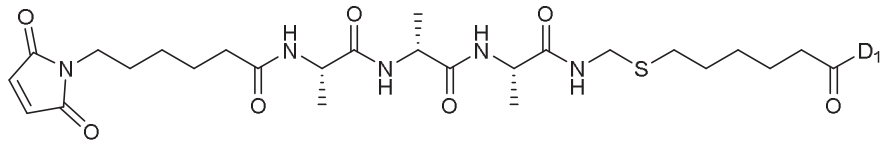


.

[00227] Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências da SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:151 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em alguma modalidade, X na SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:151 é lisina. Em algumas modalidades, X na SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:151 está ausente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:155 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

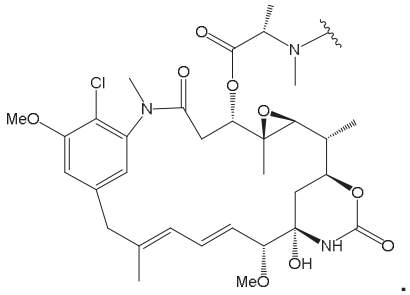
[00228] Numa 14ª modalidade, o imunoconjugado da presente in-

venção compreende um anticorpo anti-ADAM9, hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)), acoplado a um composto maitansinoide DM21C (também denominado como Mal-LDL-DM ou MalC5-LDL-DM ou composto 17a) representado pela seguinte fórmula estrutural:



(D-4),

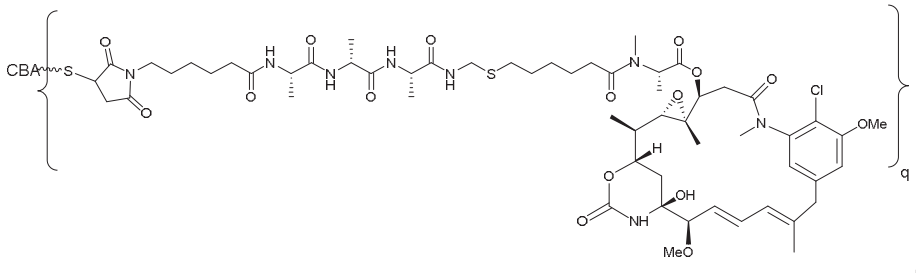
em que D_1 é representado pela seguinte fórmula:



.

[00229] O anticorpo anti-ADAM9 hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)) tem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem as sequências da SEQ ID NO:156 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o imunoconjugado é denominado no presente documento como hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM.

[00230] Numa modalidade, o imunoconjugado hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM é representado pela seguinte fórmula estrutural:



,

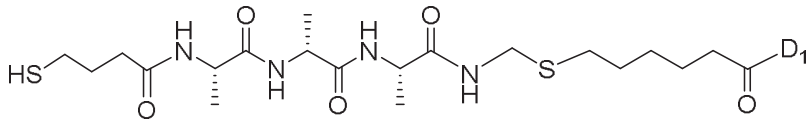
em que:

CBA é o anticorpo anti-ADAM9 hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K) conectado ao composto maitansinoide através de um grupo Cys tiol; e q é 1 ou 2.

[00231] Em certas modalidades, para composições (*por exemplo*,

composições farmacêuticas) que compreende imunoconjugados da 14ª modalidade específica, DAR está na faixa de 1,5 a 2,2, 1,7 a 2,2 ou 1,9 a 2,1. Em alguma modalidade, a DAR é 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 ou 2,1.

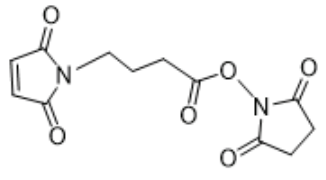
[00232] Numa 15ª modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção compreende um anticorpo anti-ADAM9, hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)), acoplado a um composto maitansinoide DM21L (também denominado como LDL-DM ou composto 14c) representado pela seguinte fórmula estrutural:



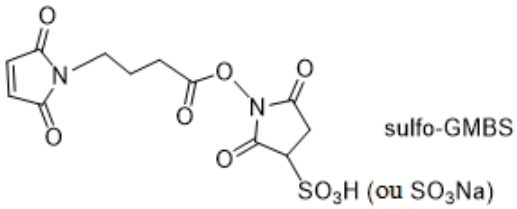
(D-2);

por meio de éster de N-succinimidila de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS) ou um ligante éster de N-(γ-maleimidobutriloxi)sulfossuccinimida (sulfo-GMBS ou sGMBS). O anticorpo anti-ADAM9 hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)) tem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem as sequências da SEQ ID NO:155 e SEQ ID NO:68, respectivamente. Em algumas modalidades, o conjugado é denominado no presente documento como hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM. O conjugado também pode ser denominado como hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-GMBS-LDL-DM, que pode ser usado de modo intercambiável com hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM.

[00233] Os ligantes GMBS e sulfo-GMBS (ou sGMBS) são conhecidos na técnica e podem ser apresentados pela seguinte fórmula estrutural:

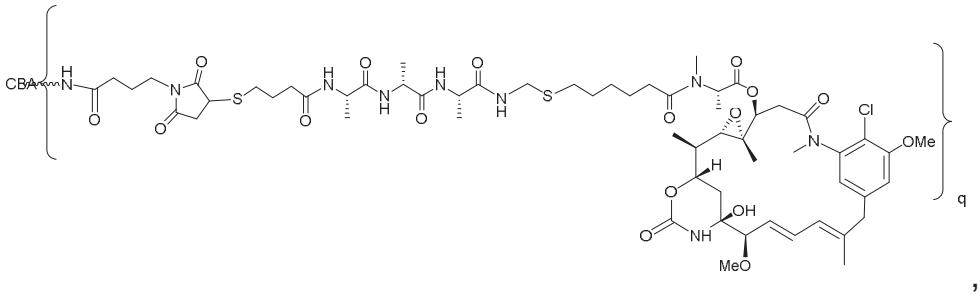


GMBS



sulfo-GMBS

[00234] Numa modalidade, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

CBA é o anticorpo anti-ADAM9 hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)) conectado ao composto maitansinoide através de um grupo Lys amina; e q é um número inteiro de 1 ou 10.

[00235] Em certas modalidades, para composições (por exemplo, composições farmacêuticas) que compreendem imunoconjugados da 15ª modalidade específica, DAR está na faixa de 3,0 a 4,0, 3,2 a 3,8, ou 3,4 a 3,7. Em algumas modalidades, a DAR é 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,5, 3,7 ou 3,8.

[00236] Em certas modalidades, para composições (por exemplo, composições farmacêuticas) que compreendem imunoconjugados da primeira modalidade, ou da 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª, 12ª, 13ª, 14ª ou 15ª modalidade específica, o número médio do agente citotóxico por molécula de anticorpo (isto é, valor médio de q), também conhecida como Razão Fármaco-Anticorpo (DAR) na composição está na faixa de 1,0 a 8,0. Em algumas modalidades, DAR está na faixa de 1,0 a 5,0, 1,0 a 4,0, 1,5 a 4,0, 2,0 a 4,0, 2,5 a 4,0, 1,0 a 3,4, 1,0 a 3,0, 2,9 a 3,3, 3,3 a 3,8, 1,5 a 2,5, 2,0 a 2,5, 1,7 a 2,3, ou 1,8 a 2,2. Em algumas modalidades, a DAR é menor do que 4,0, menor do que 3,8, menor do que 3,6, menor do que 3,5, menor do que 3,0 ou menor do que 2,5. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 3,2 a 3,4. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 3,0 a 3,2. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 3,5 a 3,7. Em algumas mo-

dalidades, a DAR é 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6 ou 3,7. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 1,8 a 2,0. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 1,7 a 1,9. Em algumas modalidades, a DAR está na faixa de 1,9 a 2,1. Em algumas modalidades, a DAR é 1,9, 2,0 ou 2,1. Em algumas modalidades, para os imunoconjugados da presente invenção que compreendem um anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a anti-ADAM9 do mesmo ligado ao composto maitansinoide através de um ou mais grupos cisteína tiol, a DAR está na faixa de 1,5 a 2,5, 1,8 a 2,2, 1,1 a 1,9 ou 1,9 a 2,1. Em algumas modalidades, a DAR é 1,8, 1,9, 2,0 ou 2,1.

C. MOLÉCULAS LIGANTES EXEMPLIFICATIVAS

[00237] Quaisquer ligantes adequados conhecidos na técnica podem ser usados no preparo dos imunoconjugados da presente invenção. Em certas modalidades, os ligantes são ligantes bifuncionais. Conforme usado no presente documento, o termo "**ligante bifuncional**" se refere a agentes de modificação que possuem dois grupos reativos; um que tem capacidade para reagir com um agente de ligação de célula enquanto o outro reage com o composto maitansinoide para ligar as duas porções químicas. Tais reticuladores bifuncionais são bem conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Isalm e Dent em *Bioconjugation* capítulo 5, páginas 218 a 363, Groves Dictionaries Inc. Nova Iorque, 1999). Por exemplo, agentes de reticulação bifuncional que possibilitam a ligação por meio de uma ligação tioéter incluem *N*-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC) para introduzir grupos maleimido, ou com *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introduzir grupos iodoacetila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que introduzem grupos maleimido ou grupos haloacetila em um agente de ligação de célula são bem conhecidos na técnica (consultar Publicações de Patente US nº 2008/0050310, 20050169933, disponíveis a partir de Pierce Biotechnology Inc. P.O.

Box 117, Rockland, IL 61105, EUA) e incluem, mas sem limitação, bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, éster de N-(β-maleimidopropiloxi)succinimida (BMPS), éster de N-succinimidila de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxissuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBS), hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico ou sal de HCl (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidila (SBAP), iodoacetato de N-succinimidila (SIA), éster de N-succinimidila de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidila (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-di-hidroxibutano (BMDB), bis-maleimido-hexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), 4-(N-maleimido-metil)ciclo-hexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC), sulfossuccinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBS), éster de N-(γ-maleimidobutriloxi) sulfossuccinimida (sulfo-GMBS ou sGMBS), éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi)sulfossuccimido (sulfo-EMCS), éster de N-(κ-maleimidoundecanoiloxi)sulfossuccinimida (sulfo-KMUS) e 4-(p-maleimidofenil) butirato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMPB).

[00238] Os agentes de reticulação heterobifuncionais são agentes de reticulação bifuncionais que têm dois grupos reativos diferentes. Os agentes de reticulação heterobifuncionais que contêm tanto um grupo *N*-hidroxissuccinimida reativo de amina (grupo NHS) e um grupo hidrazina reativo de carbonila também pode ser usado para ligar os compostos citotóxicos descritos no presente documento a um agente

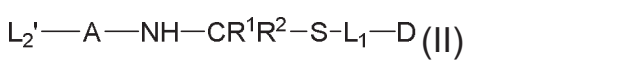
de ligação de célula (por exemplo, anticorpo). Exemplos de tais agentes de reticulação heterobifuncionais comercialmente disponíveis incluem succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), cloridrato de succinimidil 4-hidrazidotereftalato (SHTH) e cloridrato de succinimidil hidrazínio nicotinato (SHNH). Os conjugados que portam uma ligação lábil ácida também podem ser preparados com o uso de um derivado de benzodiazepina que porta hidrazina da presente invenção. Exemplos de agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados incluem benzoato de succinimidil-p-formila (SFB) e succinimidil-p-formilfenoxiacetato (SFPA).

[00239] Agentes de reticulação bifuncionais que possibilitam a ligação de agente de ligação de célula com compostos citotóxicos por meio de ligações dissulfeto são conhecidos na técnica e incluem *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB ou sSPDB) para introduzir grupos ditiopiridila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados para introduzir grupos dissulfeto são conhecidos na técnica e são descritos nas Patentes US nº 6.913.748, 6.716.821 e Publicações de Patente US nº 20090274713 e 20100129314, todos os quais são incorporados ao presente documento a título de referência. Alternativamente, agentes de reticulação, como 2-iminotiolano, homocisteína tiolactona ou anidrido S-acetilsuccínico que introduzem grupos tiol também podem ser usados.

D. MAITANSINOIDES EXEMPLIFICATIVOS

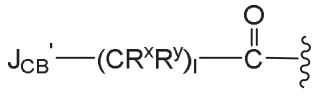
[00240] Numa segunda modalidade, a presente invenção fornece os compostos maitansinoides que podem ser usados para produzir os imunoconjugados da presente invenção.

[00241] Em algumas modalidades, o composto maitansinoide é representado pela seguinte fórmula:

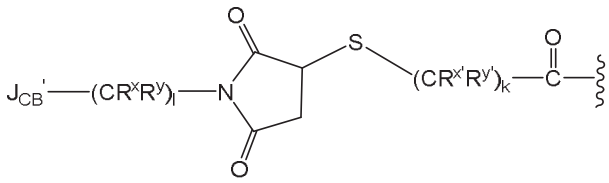


ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

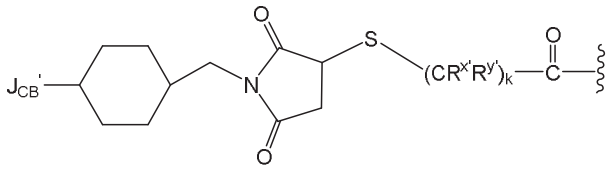
L_2' é representado pelas seguintes fórmulas estruturais:



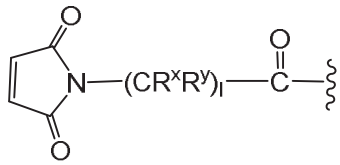
(L2a');



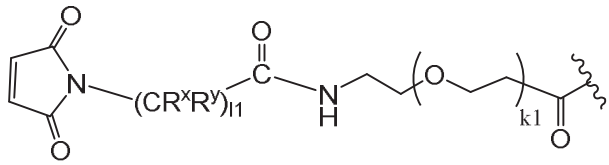
(L2b');



(L2c');



(L2d'); ou



(L2e');

em que:

R^x, R^y, $R^{x'}$ e $R^{y'}$, para cada ocorrência, são, independentemente, H, -OH, halogênio, -O-(C_{1-4} alquil), $-SO_3H$, $-NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, ou uma C_{1-4} alquila opcionalmente substituída por -OH, halogênio, $-SO_3H$ ou $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, em que R_{40}, R_{41} e R_{42} são, cada um, independentemente, H ou a C_{1-4} alquila;

l e k são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

J_{CB}' é -C(=O)OH ou –COE, em que –COE é um éster reativo;

A é um aminoácido ou um peptídeo que compreende 2 a 20 aminoácidos;

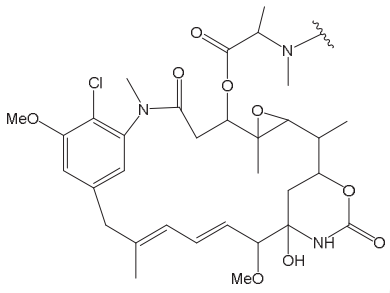
R^1 e R^2 são, cada um, independentemente, H ou uma C_{1-3}alquila;

L_1 é representado pela seguinte fórmula:

$–CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$;

em que R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me, e a porção química –C(=O)- em L_1 é conectada a D;

D é representado pela seguinte fórmula:



e

q é um número inteiro de 1 a 20.

[00242] Em algumas modalidades, o maitansinoide da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:

(III)

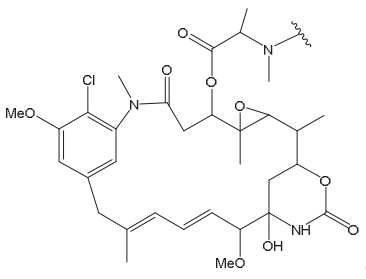
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

A’ é um aminoácido ou um peptídeo que compreende 2 a 20 aminoácidos (isto é, A-NH_2);

R^1 e R^2 são, cada um, independentemente, H ou uma C_{1-3}alquila;

L_1 é $–CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$; R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me;

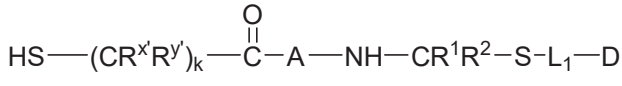
D é representado pela seguinte fórmula:



; e

q é um número inteiro de 1 a 20.

[00243] Em algumas modalidades, o maitansinoide da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



(IV),

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

$R^{x'}$ e $R^{y'}$, para cada ocorrência, são, independentemente, H, -OH, halogênio, -O-(C_{1-4} alquil), -SO_3H, -$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, ou uma C_{1-4} alquila opcionalmente substituída por -OH, halogênio, SO_3H ou $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, em que R_{40}, R_{41} e R_{42} são, cada um, independentemente, H ou a C_{1-4} alquila;

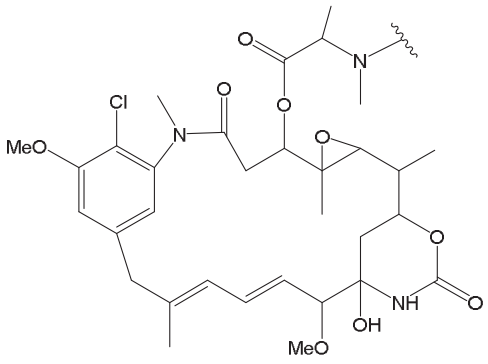
k é um número inteiro de 1 a 10

A é um resíduo de aminoácido ou um peptídeo que compreende 2 a 20 resíduos de aminoácido;

R^1 e R^2 são, cada um, independentemente, H ou uma C_{1-3}alquila;

L_1 é –CR^3R^4-$(CH_2)_{1-8}$-C(=O)-; R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me;

D é representado pela seguinte fórmula:



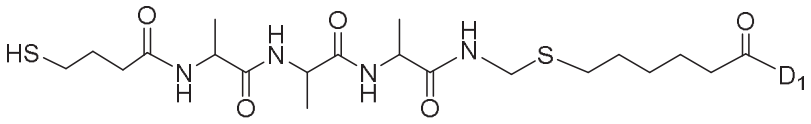
; e

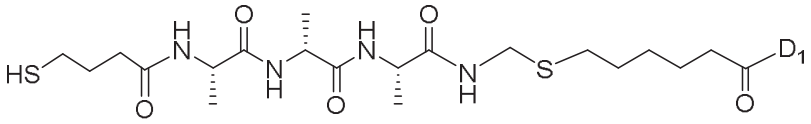
q é um número inteiro de 1 a 20.

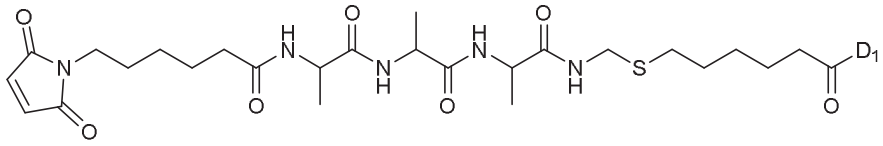
[00244] Em algumas modalidades, para os compostos maitansinoides das fórmulas (II), (III) ou (IV), as variáveis são conforme descrito na primeira modalidade, ou a 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª ou 11ª modalidade específica na primeira modalidade.

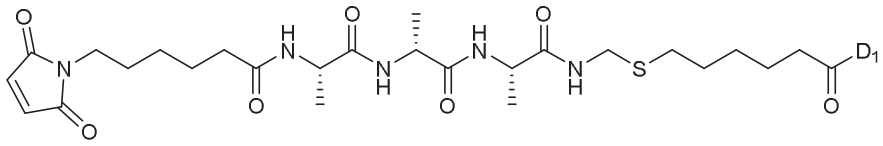
[00245] Numa modalidade específica, o composto maitansinoide é

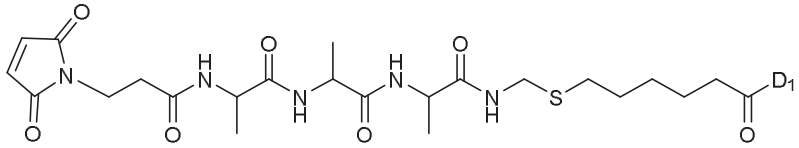
representado pela seguinte fórmula:

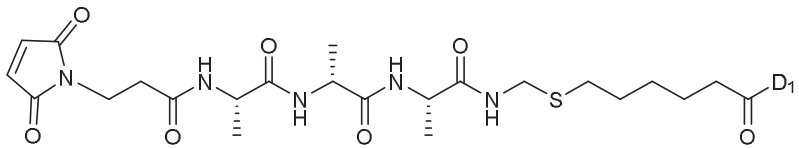

(D-1);


(D-2);

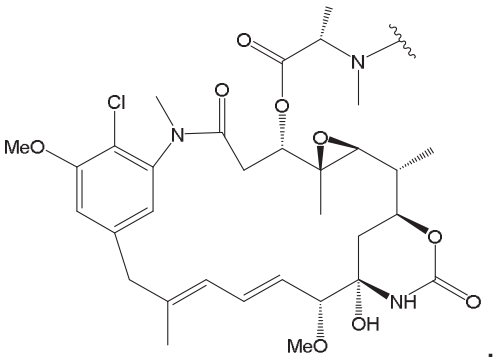

(D-3);


(D-4);


(D-5); ou


(D-6),

em que D_1 é representado pela seguinte fórmula:


.

IV. MÉTODOS DE PRODUÇÃO

[00246] Os anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos de ligação a ADAM9 do mesmo da presente invenção são produzidos, com máxima preferência, através da expressão recombinante de moléculas de ácido nucleico que codificam tais polipeptídeos, conforme bem conhecido na

técnica.

[00247] Os polipeptídeos da invenção podem ser convenientemente preparados com o uso de síntese de peptídeo de fase sólida (Merrifield, B. (1986) "S*olid Phase Synthesis*", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*", Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

[00248] Numa alternativa, anticorpos podem ser tornados recombinantes e expressos com o uso de qualquer método conhecido na técnica. Os anticorpos podem ser tornados recombinantes isolando-se primeiro os anticorpos produzidos a partir de animais hospedeiros, obtendo-se a sequência de gene e usando-se a sequência de gene para expressar o anticorpo de modo recombinante nas células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método que pode ser usado deve expressar a sequência de anticorpos em plantas {por exemplo, tabaco) ou leite transgênico. Os métodos adequados para expressar anticorpos de modo recombinante em plantas ou leite foram descritos (consultar, por exemplo, Peeters *et al.* (2001) "*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*", Int. Rev. Immunol 13:65-93; e Pollock *et al.* (1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*", J. Immunol Methods 231:147-157). Os métodos adequados para produzir derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, *etc.* são conhecidos na técnica, e foram descritos acima. Em outra alternativa, os anticorpos podem ser tornados recombinantes por tecnologia de exibição de fago (consultar, por exemplo, Patentes US nº 5.565.332; 5.580.717;

5.733.743; 6.265.150; e Winter, G. *et al.* (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*", Annu. Rev. Immunol. 12,433-455).

[00249] Os vetores que contêm polinucleotídeos de interesse (por exemplo, polinucleotídeos que codificam as cadeias de polipeptídeo dos anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos de ligação a ADAM9 do mesmo da presente invenção) podem ser introduzidos na célula hospedeira por qualquer um dentre vários meios apropriados, incluindo eletroporação, transfecção que usa cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeio de microprojéteis; lipofecção; e infecção (por exemplo, quando o vetor é um agente infeccioso, como vírus vaccinia). A escolha de introdução de vetores ou polinucleotídeos dependerá frequentemente de recursos da célula hospedeira.

[00250] Qualquer célula hospedeira capaz de superexpressar DNAs heterólogos pode ser usada com o propósito de expressar um polipeptídeo ou proteína de interesse. Os exemplos não limitantes de células hospedeiras adequadas de mamíferos incluem, mas sem limitação, células COS, HeLa e CHO.

[00251] A invenção inclui imunoconjugados que compreende uma sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo desta invenção. Os polipeptídeos desta invenção podem ser produzidos por procedimentos conhecidos na técnica. Os polipeptídeos podem ser produzidos por degradação proteolítica ou outra degradação dos anticorpos, por métodos recombinantes (isto é, polipeptídeos únicos ou de fusão) conforme descrito acima ou por síntese química. Os polipeptídeos dos anticorpos, especialmente polipeptídeos mais curtos de até 50 aminoácidos, são convenientemente feitos por síntese química. Os métodos para síntese química são bem conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis.

[00252] A invenção inclui imunoconjugados que compreendem variantes de anticorpos anti-ADAM9 e fragmentos dos mesmos, incluindo polipeptídeos funcionalmente equivalentes que não afetam significativamente as propriedades de tais moléculas, assim como variantes que têm atividade intensificada ou diminuída. A modificação de polipeptídeos é prática de rotina na técnica e não precisa ser descrita em detalhes no presente documento. Exemplos de polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos com substituições conservativas de resíduos de aminoácido, uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não mudam de modo deletério a atividade funcional, ou uso de análogos químicos. Os resíduos de aminoácido que podem ser substituídos de modo conservativo entre si incluem, mas sem limitação: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutâmico; lisina/arginina; e fenilalanina/tirosina. Estes polipeptídeos também incluem polipeptídeos glicosilados e não glicosilados, assim como polipeptídeos com outras modificações pós-tradução, como, por exemplo, glicosilação com açúcares diferentes, acetilação e fosforilação. Preferencialmente, as substituições de aminoácido seriam conservativas, isto é, o aminoácido substituído possuiria propriedades químicas similares àquelas do aminoácido original. Tais substituições conservativas são conhecidas na técnica e os exemplos foram fornecidos acima. As modificações de aminoácidos podem estar na faixa de mudar ou modificar um ou mais aminoácidos para o reprojeto completo de uma região, como o Domínio Variável. As mudanças no Domínio Variável podem alterar a afinidade de ligação e/ou especificidade. Outros métodos de modificação incluem o uso de técnicas de acoplamento conhecidas na arte, incluindo, mas sem limitação, meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. As modificações podem ser usadas, por exemplo, para a ligação de identificadores para imunoensaio, como a ligação de porções químicas

radioativas para radioimunoensaio. Os polipeptídeos modificados são produzidos com o uso de procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser triados com o uso de ensaios padrão conhecidos na técnica.

[00253] A invenção abrange imunoconjugados que compreendem proteínas de fusão que possuem um ou mais dos anti-ADAM9-VL e/ou VH desta invenção. Numa modalidade, um polipeptídeo de fusão é fornecido, o qual compreende uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou tanto uma cadeia leve quanto pesada. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão contém uma região constante de imunoglobulina heteróloga. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão contém um Domínio Variável de Cadeia Leve e um Domínio Variável de Cadeia Pesada de um anticorpo produzido a partir de um hibridoma publicamente depositado. Com propósitos desta invenção, uma proteína de fusão de anticorpo contém um ou mais domínios polipeptídicos que se ligam especificamente a ADAM9 e outra sequência de aminoácidos à qual não se liga na molécula nativa, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região.

[00254] A presente invenção também fornece polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeo que codifica um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo desta invenção.

[00255] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia leve hMAB-A VL (2) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68, em que o polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO**:157**:

gacattgtgatgacccaatctccagattctttggctgtgtctctaggggagagggccacc
atctcctgcaaggccagccaaagtgttgattactctggtgatagttatatgaactggtac
caacagaaaccaggacagccacccaaactcctcatctatgctgcatccgacctagaatct
ggaatcccagccaggtttagtggcagtgggtctgggacagacttcaccctcactatctct
agcctggagcctgaggatttcgcaacctattactgtcagcaaagtcatgaagacccgttc
acgttcggacaagggaccaagctcgaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttc
atcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg
aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg
ggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc
agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtc
acccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

[00256] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia leve hMAB-A VL (2) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:68, em que o polinucleotídeo é otimizado por códon e tem a sequência de nucleotídeo da **SEQ ID NO:158:**

gacattgtgatgacgcagtcccccgactccctggccgtgtccttgggcgaaagggccac
aatcagctgcaaggcatcacagagcgtggactactctggggacagctacatgaattggt
accagcagaagcccgggcagcctccaaagctgctgatctacgccgcatccgacctggag
tccggcatcccggcgcggttctcgggttcgggatccggcactgacttcaccctgaccat
ctcaagcctggagcccgaggactttgcgacctactactgccaacagtcccacgaagatc
cgtttaccttcggacaaggcaccaagctcgagatcaagagaactgtggccgccccgagc
gtgttcattttcccgccatcggatgagcaactgaagtccggaactgcgagcgtggtctg
cctcctcaacaacttctatcctcgggaagccaaagtgcagtggaaggtcgacaacgctc
tgcagtccggaaactcccaagagagcgtgaccgaacaggattccaaggactcgacctac
tcgctgtcatccactctgaccctgagcaaggccgattacgaaaagcacaaagtgtacgc
ttgcgaagtgacccaccagggactgtcatcccctgtgaccaagtcgttcaaccgcggcg
aatgc

[00257] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada hMAB-A VH (2I) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:151, em que o polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeo da **SEQ ID NO:159:**

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagact
gtcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacagg
cacctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaac
tacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacact
gtacctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagag
ggggttattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccact
gtgacagtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctc
caagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccg
aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccg
gctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg
tggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac
cctctatatcacccgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtx
xx

em que xxx são aaa ou estão ausentes.

[00258] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada hMAB-A VH (2I) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:155, em que o polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeo da **SEQ ID NO:160:**

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagact
gtcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacagg
cacctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaac
tacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacact
gtacctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagag
ggggttattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccact
gtgacagtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctc
caagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccg
aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccg
gctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg
tggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac
cctctatatcacccgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

[00259] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada hMAB-A VH (2I) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:156, em que o polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeo da **SEQ ID NO:161:**

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagactg
tcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacaggca
cctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaactac
aatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacactgtac
ctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagaggggt
tattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccactgtgaca
gtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtg
acggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
acccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactc
ctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctctatatcacc
cgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag
ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag
cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaa
accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc
cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
cactacacgcagaagagcctctgcctgtctccgggt

[00260] Em certas modalidades, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada hMAB-A VH (2I) que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:156, em que o polinucleotídeo é otimizado por códon e tem a sequência de nucleotídeo da **SEQ ID NO:162:**

gaagtccaactggtggaatcgggggcggcctcgtgaagcccggaggatccctgaggctc
tcctgcgccgcctccgggttcacttttcgtcatactggatgcattgggtccgccaggcc
ccggggaagggactggaatgggtcggagagatcatccccattttcggccacacaaactac
aacgaaaagttcaagagccgctttactatttccttggacaattcaaagaacaccctgtat
ctgcaaatgggaagcctgcgggccgaggacaccgctgtgtactactgcgcccggggtggc
tactattactacccgagacagggtttcctcgattactggggccagggaaccaccgtgacc
gtgtcctctgcctcgaccaaaggcccctcggtgttcccgcttgcgccatcctccaaatcc
acctccggcggcaccgccgctctgggatgcctggtcaaagattacttcccggagcctgtg
acggtgtcgtggaactctggagccctcacgagcggagtgcataccttccctgcggtgctc
caatcgtccggactgtacagcctgagcagcgtcgtcactgtgcctagctcgtccctgggc
acccagacctacatttgcaacgtgaaccataagccttcaaacactaaggtcgacaaacgg
gtggaacccaagtcgtgcgataagactcatacttgcccgccttgccccgcgcctgaactt
ttgggagggccgtccgtgttcctgttcccgccaaagccaaaggacactctgtacatcact
cgcgaacccgaagtgacctgtgtggtcgtggacgtgtcccacgaggatccggaagtcaag
ttcaattggtacgtggacggtgtcgaggtgcacaacgcaaagaccaagccgcgcgaggaa
cagtacaactccacataccgggtggtgtcagtgctgaccgtgttgcaccaggactggctc
aacggaaaggagtacaagtgcaaagtgtccaacaaggccctgcctgcaccaatcgaaaag
accattagcaaggccaaggggcagccccgggagccccaagtgtacactctgcccccgtca
cgggaagaaatgaccaagaaccaagtgtcactgacctgtcttgtgaagggtttctacccc
tccgacatcgccgtggagtgggagtccaacggacagccggagaacaattacaagactacc
ccgccggtgctggatagcgacggctccttcttcctgtactccaagctgaccgtggacaag
tcgagatggcagcaggggaacgtgttctcgtgctccgtgatgcacgaagcgctgcacaac
cactatacccagaagtccctgtgcctgtcccctgga

V. CONJUGAÇÃO DE FÁRMACO

[00261] Os imunoconjugados que compreendem um anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo covalentemente ligado a um composto maitansinoide descrito no presente documento pode ser preparado de acordo com quaisquer métodos adequados conhecidos na técnica.

[00262] Em certas modalidades, os imunoconjugados da primeira modalidade podem ser preparados por um primeiro método que compreende as etapas de reagir o anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (II) descrito na segunda modalidade.

[00263] Em certas modalidades, os imunoconjugados da primeira

modalidade podem ser preparados por um segundo método que compreende as etapas de:

(a) reagir o composto maitansinoide de fórmula (III) ou (IV) com um composto ligante descrito no presente documento para formar um agente citotóxico-composto maitansinoide que tem um grupo reativo amina ou um grupo reativo tiol ligado ao mesmo que pode ser covalentemente ligado ao anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo (ou CBA); e

(b) reagir o anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto ligante maitansinoide para formar o imunoconjugado.

[00264] Em certas modalidades, os imunoconjugados da primeira modalidade podem ser preparados por um terceiro método que compreende as etapas de:

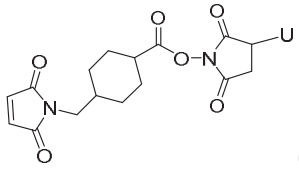
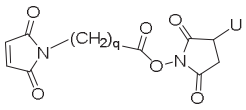
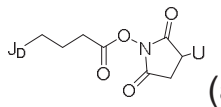
(a) reagir o anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com um composto ligante descrito no presente documento como formando um anticorpo anti-ADAM9 modificado ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que tem um grupo reativo amina ou um grupo reativo tiol ligado ao mesmo (por exemplo, composto de fórmula (II)) que pode ser covalentemente ligado ao composto maitansinoide de fórmula (III) ou (IV); e

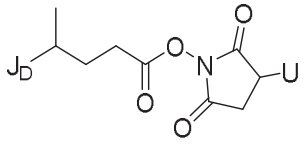
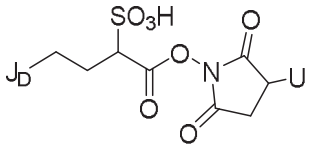
(b) reagir o anticorpo anti-ADAM9 modificado ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (III) ou (IV) para formar o imunoconjugado.

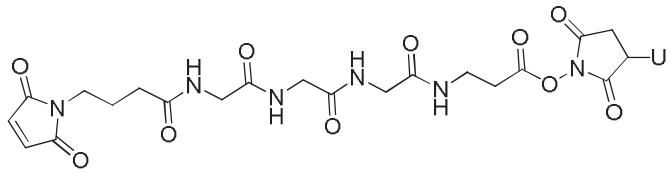
[00265] Em certas modalidades, os imunoconjugados da primeira modalidade podem ser preparados por um terceiro método que compreende reagir um anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo, um composto ligante e um composto maitansinoide de fórmula (III) ou (IV) para formar os imunoconjugados. Numa modalidade, o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a

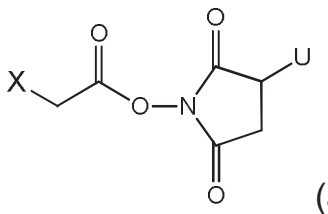
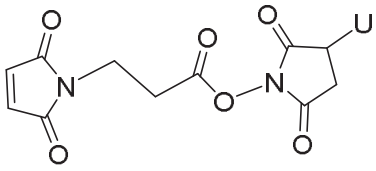
ADAM9 do mesmo e o composto maitansinoide de fórmula (III) ou (IV) são misturados primeiro, seguido pela adição do composto ligante.

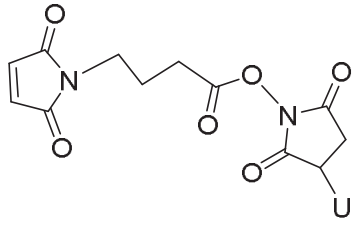
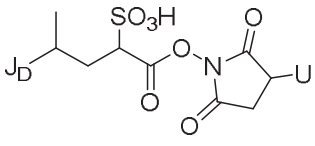
[00266] Em certas modalidades, para o segundo, terceiro ou quarto métodos descritos acima, o composto ligante é representado por qualquer um dentre as fórmulas (a1L) a (a10L):


(a1L);

(a2L);

(a3L);


(a4L);

(a5L),


(a6L),

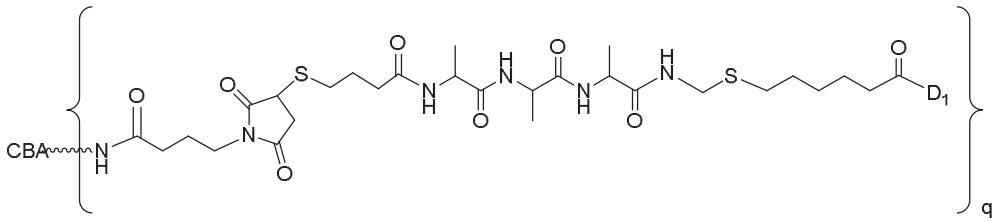

(a7L);

(a8L);


(a9L); e

(a10L),

em que X é halogênio; J_D –SH, ou –SSR^d; R^d é fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila ou nitropiridila; R^g é uma alquila; e U é –H ou SO_3H ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00267] Numa modalidade, o composto ligante é GMBS ou sulfo-GMBS representado pela fórmula (a9L), em que U é –H ou SO_3H ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

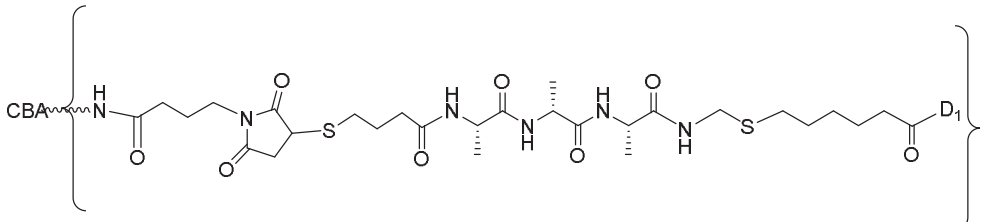
[00268] Numa modalidade específica, o imunoconjugado da presente invenção é representado pela seguinte fórmula:



(I-1);

e o imunoconjugado pode ser preparado pelo segundo, terceiro ou quarto método descrito acima, em que o composto ligante é GMBS ou sulfo-GMBS representado pela fórmula (a9L), em que U é –H ou SO_3H ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; e o composto maitansinoide é representado pela fórmula (D-1) descrita acima. Numa modalidade mais específica, o imunoconjugado da fórmula (I-1) é preparado reagindo-se o composto maitansinoide da fórmula (D-1) com o composto ligante GMBS ou sulfo-GMBS para formar um composto ligante maitansinoide, seguido pela reação do anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto ligante maitansinoide. Numa modalidade ainda mais específica, o composto ligante maitansinoide não é purificado antes de reagir com o anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo.

[00269] Em outra modalidade específica, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:

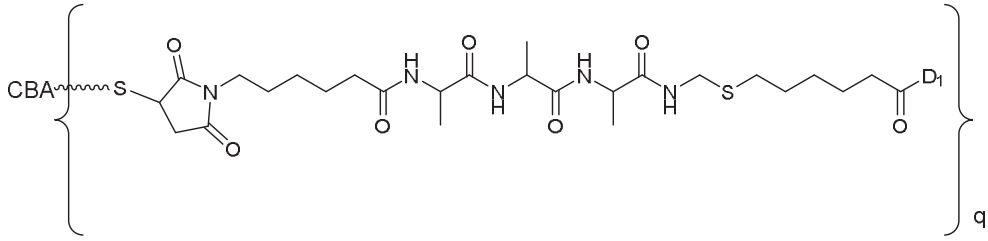


(I-2); e

o imunoconjugado pode ser preparado pelo segundo, terceiro ou quarto método descrito acima, em que o composto ligante é GMBS ou sulfo-GMBS representado pela fórmula (a9L), em que U é –H ou SO_3H ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; e o composto maitansinoide é representado pela fórmula (D-2) descrita acima. Numa modalidade mais específica, o imunoconjugado da fórmula (I-2) é preparado reagindo-se o composto maitansinoide da fórmula (D-2) com o com-

posto ligante GMBS ou sulfo-GMBS para formar um composto ligante maitansinoide, seguido pela reação do anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto ligante maitansinoide. Numa modalidade ainda mais específica, o composto ligante maitansinoide não é purificado antes de reagir com o anticorpo anti-ADAM9 ou um fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo.

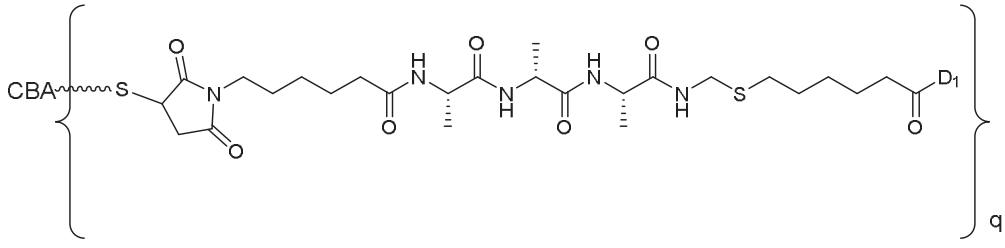
[00270] Em outra modalidade específica, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:



(I-3); e

o imunoconjugado é preparado de acordo com o primeiro método descrito acima reagindo-se o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (D-3) descrito acima.

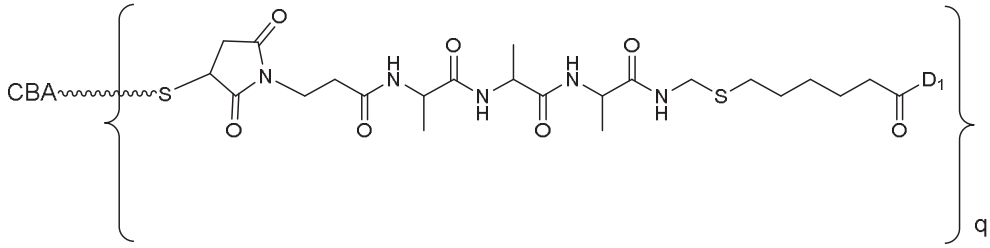
[00271] Em outra modalidade específica, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:



(I-4);

e o imunoconjugado é preparado de acordo com o primeiro método descrito acima reagindo-se o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (D-4) descrito acima.

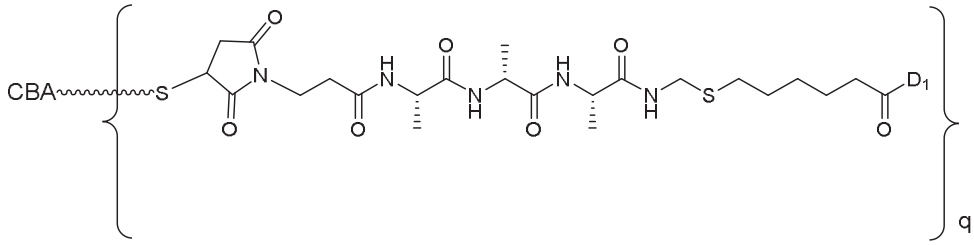
[00272] Em outra modalidade específica, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:



(I-5); e

o imunoconjugado é preparado de acordo com o primeiro método descrito acima reagindo-se o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (D-5) descrito acima.

[00273] Em outra modalidade específica, o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:



(I-6); e

o imunoconjugado é preparado de acordo com o primeiro método descrito acima reagindo-se o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo com o composto maitansinoide de fórmula (D-6) descrito acima

[00274] Em algumas modalidades, os imunoconjugados preparados por quaisquer métodos descritos acima é submetido a uma etapa de purificação. Neste aspecto, o imunoconjugado pode ser purificado a partir dos outros componentes da mistura com o uso de filtração de fluxo tangencial (TFF), cromatografia não adsortiva, cromatografia adsortiva, filtração adsortiva, preparação seletiva, ou qualquer outro processo de purificação adequado, assim como combinações dos mesmos.

[00275] Em algumas modalidades, o imunoconjugado é purificado com o uso de uma etapa de purificação única (por exemplo, TFF). Preferencialmente, o conjugado é purificado e trocado na formulação

apropriada com o uso de uma etapa de purificação única (por exemplo, TFF). Em outras modalidades da invenção, o imunoconjugado é purificado com o uso de duas etapas de purificação sequenciais. Por exemplo, o imunoconjugado pode ser primeiro purificado por precipitação seletiva, filtração adsortiva, cromatografia absortiva ou cromatografia não absorptiva, seguido por purificação com TFF. Um indivíduo de habilidade comum na técnica observará que a purificação do imunoconjugado possibilite o isolamento de um conjugado estável que compreende o agente de ligação de célula quimicamente acoplado ao agente citotóxico.

[00276] Quaisquer sistemas de TFF adequados podem ser utilizados para a purificação, incluindo um sistema do tipo Pellicon (Millipore, Billerica, Mass.), um sistema Sartocon Cassette (Sartorius AG, Edgewood, N.Y.), e um sistema do tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, N.Y.)

[00277] Qualquer resina de cromatografia adsortiva adequada pode ser utilizada para a purificação. As resinas de cromatografia adsortiva preferenciais incluem cromatografia hidroxiapatita, cromatografia por indução de carga hidrofóbica (HCIC), cromatografia por interação hidrofóbica (HIC), cromatografia por troca iônica, cromatografia por troca iônica de modo misturado, cromatografia por afinidade de metal imobilizado (IMAC), cromatografia por ligante de corante, cromatografia por afinidade, cromatografia de fase reversa e combinações dos mesmos. Exemplos de resinas de hidroxiapatita adequadas incluem hidroxiapatita cerâmica (CHT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), HA Ultrogel hidroxiapatita (Pall Corp., East Hills, N.Y.), e fluoroapatite cerâmica (CFT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Um exemplo de uma resina HCIC adequada é a resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, N.Y.). Exemplos de resinas HIC adequadas incluem resinas Butil-Sepharose, Hexil-Sepharose, Fenil-

Sepharose e Octil Sepharose (todos de GE Healthcare, Piscataway, N.J.), assim como resinas Macro-prep Metila e Macro-Prep t-Butila (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de resinas de troca iônica adequadas incluem as resinas SP-Sepharose, CM-Sepharose e Q-Sepharose (todos dentre GE Healthcare, Piscataway, N.J.), e resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de trocadores de íons de modo misturado adequados incluem resina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg N.J.) Exemplos de resinas IMAC adequadas incluem resina Chelating Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) e resina Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de resinas de ligante de corante adequados incluem a resina Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) e resina Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Os exemplos de resinas de afinidade adequadas incluem a resina Proteína A Sepharose (por exemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), em que o agente de ligação de célula é um anticorpo, e resinas de afinidade de lectina, por exemplo, resina Lentil Lectina Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.), em que o agente de ligação de célula porta sítios de ligação de lectina apropriados. Alternativamente, um anticorpo específico para o agente de ligação de célula pode ser usado. Tal anticorpo pode ser imobilizado, por exemplo, resina Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, N.J.). Exemplos de resina de fase reversa adequados incluem as resinas C4, C8 e C18 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.).

[00278] Qualquer resina de cromatografia não adsortiva adequada pode ser utilizada para a purificação. Exemplos de resinas de cromatografia não adsortiva adequadas incluem, mas sem limitação, as resinas SEPHADEXTM G-25, G-50, G-100, SEPHACRYLTM (por exemplo, S-200 e S-300), resinas SUPERDEXTM (por exemplo, SUPERDEXTM 75 e SUPERDEXTM 200), resinas BIO-GEL® (por exemplo,

P-6, P-10, P-30, P-60, e P-100), e outros conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica.

VI. USOS DOS IMUNOCONJUGADOS DA PRESENTE INVENÇÃO

[00279] A presente invenção abrange composições, incluindo composições farmacêuticas, que compreendem os imunoconjugados da presente invenção.

[00280] Conforme fornecido no presente documento, os imunoconjugados da presente invenção, que compreendem os Domínios VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados fornecidos no presente documento, têm a capacidade de se ligar à ADAM9 presente na superfície de uma célula e mediar o extermínio celular. Em particular, os imunoconjugados da presente invenção que compreendem um agente farmacológico, são internalizados e mediam o extermínio celular por meio da atividade do agente farmacológico. Tal atividade de extermínio celular pode ser aumentada pelo imunoconjugado que induz citotoxicidade mediado por célula dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC)

[00281] Deste modo, os imunoconjugados da presente invenção, que compreendem os Domínios VL e/ou VH anti-ADAM9 humanizados/otimizados fornecidos no presente documento, têm a capacidade de tratar qualquer doença ou afecção associada a ou caracterizada pela expressão de ADAM9. Conforme discutido acima, ADAM9 é um antígeno oncoembrionário expresso em várias malignidades sanguíneas e sólidas que é associado a tumores de alto grau que exibem uma morfologia menos diferenciada, e é correlacionada a resultados clínicos insatisfatórios. Deste modo, sem limitação, os imunoconjugados da presente invenção podem ser usados no tratamento de câncer, particularmente, um câncer caracterizado pela expressão de ADAM9.

[00282] Em outras modalidades particulares, imunoconjugados da presente invenção podem ser úteis no tratamento de câncer de pul-

mão (por exemplo, câncer de pulmão de células não pequenas), câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer gástrico, câncer pancreático, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer esofágico, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer uterino, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer cervical, câncer de tireoide, câncer testicular, câncer mieloide, melanoma e câncer linfoide. Em outras modalidades particulares, imunoconjugados da presente invenção podem ser úteis no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de mama (por exemplo, câncer de mama triplo negativo (TNBC)), ou câncer pancreático.

[00283] Em modalidades adicionais, imunoconjugados da presente invenção podem ser úteis no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (células escamosas, células não escamosas, adenocarcinoma ou carcinoma não diferenciado de células grandes), câncer colorretal (adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma, ou carcinoma de células escamosas) ou câncer de mama (por exemplo, câncer de mama triplo negativo (TNBC)).

[00284] Além de sua utilidade na terapia, os imunoconjugados da presente invenção podem ser identificados de modo detectável e usados no diagnóstico de câncer ou na imaginologia de tumores e células tumorais.

VII. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00285] As composições da invenção incluem composições de fármaco volumosas úteis na fabricação de composições farmacêuticas (por exemplo, composições impuras ou não estéreis) e composições farmacêuticas (isto é, composições que são adequadas para a administração a um indivíduo ou paciente) que podem ser usadas na preparação de formas de dosagem unitárias. Tais composições compre-

endem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz dos imunoconjugados da presente invenção, ou uma combinação de tais agentes e um transportador farmaceuticamente aceitável. Preferencialmente, as composições compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de imunoconjugados da presente invenção e um transportador farmaceuticamente aceitável. A invenção também abrange tais composições farmacêuticas que incluem adicionalmente um segundo anticorpo terapêutico (por exemplo, anticorpo monoclonal específico de tumor) que é específico para um antígeno de câncer particular, e um transportador farmaceuticamente aceitável.

[00286] Numa modalidade específica, o termo "**farmaceuticamente aceitável**" significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopeia dos E.U.A. ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em seres humanos. O termo "**transportador**" se refere a um diluente, adjuvante (por exemplo, adjuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente ou veículo com o qual o produto terapêutico é administrado. Em geral, os ingredientes de composições da invenção são fornecidos separadamente ou misturados juntos em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente vedado, como uma ampola ou sachê que indica a quantidade de agente ativo. Quando a composição deve ser administrada por infusão, a mesma pode ser dispensada com uma garrafa de infusão que contém água de grau farmacêutico estéril ou solução salina. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser fornecida de modo que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

[00287] A invenção também fornece um pacote farmacêutico ou kit que compreende um ou mais recipientes carregados com imunoconju-

gados da presente invenção, sozinho ou com tal transportador farmaceuticamente aceitável. Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma doença também podem ser incluídos no pacote ou kit farmacêutico. A invenção também fornece um kit ou pacote farmacêutico que compreende um ou mais recipiente preenchidos com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos pode ser opcionalmente associado a tal recipiente (ou recipientes), cujo aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

[00288] A presente invenção fornece kits que podem ser usados nos métodos acima. Um kit pode compreender qualquer um dos imunoconjugados da presente invenção. O kit pode compreender adicionalmente um ou mais outros agentes profiláticos e/ou terapêuticos úteis para o tratamento de câncer, em um ou mais recipientes.

VIII. MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[00289] As composições da presente invenção podem ser fornecidas para o tratamento, profilaxia, e amenização de um ou mais sintomas associados a uma doença, distúrbio por administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de m imunoconjugado da invenção. Em um aspecto preferencial, tais composições são substancialmente purificadas (isto é, substancialmente livres de substâncias que limitam seu efeito ou produzem efeitos colaterais indesejáveis). Numa modalidade específica, o indivíduo é um animal, preferencialmente um mamífero, como não primata (por exemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, *etc.*) ou um primata (por exemplo, macaco, como um macaco cynomolgus, ser humano, *etc.*). Numa modalidade preferencial, o indivíduo é um ser humano.

[00290] Vários sistemas de administração são conhecidos e podem ser usados para administrar as composições da invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar o anticorpo ou proteína de fusão, endocitose mediada por receptor (consultar, por exemplo, Wu *et al.* (1987) *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System",* J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construção de um ácido nucleico como parte de um vetor retroviral ou outro vetor, *etc.*

[00291] Os métodos para administrar um imunoconjugado da invenção incluem, mas sem limitação, administração parenteral (por exemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), epidural e mucosal (por exemplo, vias intranasal e oral). Numa modalidade específica, os imunoconjugados da presente invenção são administrados de modo intramuscular, intravenoso ou subcutâneo. As composições podem ser administradas por qualquer rota conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção de bolo, e pode ser administrada junto com outros agentes biologicamente ativos. Administração pode ser sistemática ou local.

[00292] A invenção também fornece as preparações dos imunoconjugados da presente invenção embaladas em um recipiente hermeticamente vedado, como uma ampola ou sachê que indica a quantidade da molécula. Numa modalidade, tais moléculas são fornecidas como um pó liofilizado esterilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente vedado e pode ser reconstituído, por exemplo, com água ou solução salina para a concentração apropriada para administração a um indivíduo. Preferencialmente, os imunoconjugados da presente invenção são fornecidos como um pó liofilizado estéril seco em um recipiente hermeticamente vedado.

[00293] As preparações liofilizadas dos imunoconjugados da pre-

sente invenção devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C em seu recipiente original e as moléculas devem ser administradas em 12 horas, preferencialmente em 6 horas, em 5 horas, em 3 horas, ou em 1 hora após serem reconstituídas. Numa modalidade alternativa, tais moléculas são fornecidas em forma líquida em um recipiente hermeticamente vedado que indica a quantidade e concentração da molécula, proteína de fusão, ou molécula conjugada. Preferencialmente, tais imunoconjugados, quando fornecidos em forma líquida, são fornecidos em um recipiente hermeticamente vedado.

[00294] Conforme usado no presente documento, uma "**quantidade eficaz**" de uma composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejáveis incluindo, sem limitação, resultados clínicos, como diminuir sintomas resultantes da doença, atenuar um sintoma de infecção (por exemplo, carga viral, febre, dores, sepse, etc.) ou um sintoma de câncer (por exemplo, a proliferação de células de câncer, presença de tumor, metástase de tumor, *etc*.), assim aumentando a qualidade de vida daqueles que sofrem da doença, diminuir a dose de outros medicamentos necessários para tratar a doença, intensificar o efeito de outro medicamento, como por meio de alvejamento e/ou internalização, atrasar o progresso da doença, e/ ou prolongar a sobrevivência de indivíduos. Uma quantidade eficaz pode ser administrar numa ou mais administrações. Com propósitos desta invenção, uma quantidade eficaz de fármaco, composto ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente: para exterminar e/ou reduzir a proliferação de células de câncer e/ou eliminar, reduzir e/ou atrasar o desenvolvimento de metástase de um sítio primário de câncer.

[00295] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas localmente à área que necessita de tratamento; isto pode ser alcançado por, por exemplo, e não a título de limitação, infusão

local, por injeção, ou por meio de um implante, sendo que o dito implante é de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, como membranas sialásticas ou fibras. Preferencialmente, durante a administração de um imunoconjugado da invenção, devem ser tomados cuidados no uso dos materiais que a molécula não absorve.

[00296] As composições da invenção podem ser entregues numa vesícula, em particular, um lipossomo (*See* Langer (1990) *"New Methods Of Drug Delivery",* Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, em LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss, Nova Iorque, páginas 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., páginas 317-327).

EXEMPLOS

[00297] Tendo descrito a invenção de modo mais geral, a mesma será mais prontamente entendida através de referência aos Exemplos a seguir. Os seguintes exemplos ilustram vários métodos para composições no diagnóstico ou métodos de tratamento da invenção. Os exemplos são destinados a ilustrar, mas sem limitação, o escopo da invenção.

EXEMPLO 1

ESPECIFICIDADE DE CÉLULA TUMORAL DO ANTICORPO MAB-A ANTI-ADAM9

[00298] Um anticorpo anti-ADAM9 murino (designado no presente documento como MAB-A) foi identificado, o qual: (1) bloqueia a atividade de processamento de proteína-alvo de ADAM9; (2) é internalizado; e (3) tem atividade antitumoral (consultar, por exemplo, Patente US nº 8361475). A especificidade de célula tumoral de MAB-A foi investigada por IHC. O tecido de tumor foi contatado com MAB-A (0,4 µg/ml) ou um controle de isotipo (0,4 µg/ml) e a extensão de coloração foi visualizada. MAB-A foi constatado como identificando fortemente uma

variedade de tipos de células de carcinoma de células grandes, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma câncer de pulmão de células não pequenas (**Figura 1A**), células de câncer de mama, células de câncer de próstata, células de câncer gástrico (**Figura 1B**), assim como amostras de câncer de cólon (**Figura 1C**). O tecido normal foi contatado com MAB-A (1,25 µg/ml) e a extensão de coloração foi visualizada. Conforme resumido na **Tabela 2** acima, MAB-A exibiu pouca ou nenhuma coloração de uma ampla variedade de tecidos normais. Será observado que a concentração de MAB-A usada nestes estudos foi quase 3 vezes aquela usada para a coloração de células tumorais. Os resultados destes estudos de IHC indicam que MAB-A exibe forte ligação preferencial a células tumorais sobre células normais.

EXEMPLO 2

REATIVIDADE CRUZADA DE ESPÉCIES

[00299] A ligação de MAB-A à ADAM9 humana (huADAM9) e ADAM9 de macaco cynomolgus (cynoADAM9) foi examinada. Brevemente, as células 293-FT e CHO-K que expressam de modo transiente huADAM9, cynoADAM9, um antígeno não relacionado ou as células parentais não transfectadas foram incubadas com MAB-A seguido por anticorpo secundário anti-murino-PE de cabra e analisadas por FACS. Conforme mostrado na Figura **2**, MAB-A exibe forte ligação à huADAM9 expressa de modo transiente em ambos os tipos de células. MAB-A exibe ligação insatisfatória à cynoADAM9. MAB-A não se ligou a células parentais ou células que expressam um antígeno irrelevante. Baixos níveis similares de ligação a cynoADAM foram vistos em ensaios ELISA.

EXEMPLO 3

HUMANIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO INICIAL

[00300] A humanização de MAB-A rendeu um Domínio VH humani-

zado, designado no presente documento como **"hMAB-A VH(1)**" e um Domínio VL humanizado designado no presente documento como "hMAB-A VL(1)". Os Domínios Variáveis humanizados foram, então, otimizados para intensificar a atividade de ligação e/ou para remover resíduos de aminoácido potencialmente lábeis, conforme descrito em mais detalhes abaixo. A primeira vez de otimização rende três Domínios VH humanizados adicionais, designados no presente documento como "**hMAB-A VH(2)**", "**hMAB-A VH(3)**" e "**hMAB-A VH(4)**", e três Domínios VL humanizados adicionais designados no presente documento como "**hMAB-A VL(2)**", "**hMAB-A VL(3)**" e "**hMAB-A VL(4)**". Além disto, uma versão quimérica de MAB-A ("**chMAB-A**") que tem os Domínios VH e VL murinos e regiões constantes humanas foi gerada. As sequências de aminoácidos do murino e os Domínios VH e VL humanizados/otimizados são fornecidas acima, um alinhamento é fornecido nas **Figuras 3A** e **3B**. A sequência de consenso destes Domínios VH e VL humanizados/otimizados é fornecida acima. Quando múltiplos Domínios Variáveis humanizados foram gerados, os Domínios Variáveis de cadeia pesada e leve humanizados de um anticorpo anti-ADAM9 particular (por exemplo, MAB-A) podem ser usados em qualquer combinação e combinações particulares de cadeias humanizadas são denominados a título de referência aos Domínios VH/VL específicos, por exemplo, um anticorpo que compreende hMAB-A VH(1) e hMAB-A VL(2) é especificamente denominado **"**hMAB-A (1.2)".

[00301] hMAB-A VH(1) foi gerado tendo as regiões de framework derivadas de linhas germinativas humanas VH3-21 e VH3-64, e hMAB-A VL(1) foi gerado tendo as regiões de framework derivadas de linhas germinativas humanas B3 e L6. As CDRs murinas foram retidas nestes domínios variáveis humanizados.

[00302] Um sítio de desamidação potencial foi identificado na CDR_H2 (mostrada em sublinhado único na Figura **3A**) e um sítio de

isomerização de ácido aspártico potencial foi identificado na CDR_L1 (mostrada em sublinhado único na Figura **3B**). As substituições de aminoácidos nestas posições foram examinadas como identificando substituições para remover estes sítios enquanto mantêm a afinidade de ligação. Uma substituição de fenilalanina na posição 54 (N54F) de CDR_H2 (presente em hMAB-A VH(2)) e em serina na posição 28 (D28S) de CDR_L1 (presente em hMAB-A VL(2)) foi selecionada, em que a numeração é de acordo com Kabat. As substituições identificadas podem ser usadas separadamente ou em combinação. Surpreendentemente, anticorpos que compreendem a substituição N54F foram constatados como exibindo um aumento de cerca de 2 vezes na afinidade por ADAM9 humana (consultar, por exemplo, **Tabela 3**, abaixo) e ligação levemente melhorada à ADAM9 de cynomolgus.

[00303] Adicionalmente, variantes otimizadas foram geradas para minimizar o número de resíduos de lisina presentes nas CDRs. Dois resíduos de lisina estão presentes na CDR_H2 (indicada com um sublinhado duplo na Figura **3A**), e uma lisina está presente na CDR_L1 (indicada com um sublinhado duplo na Figura **3B**). As substituições de aminoácidos nestas posições foram examinadas como identificando substituições que mantiveram a afinidade de ligação. As substituições de arginina na posição 62 (K62R), de glutamina na posição 64 (K64Q), e serina na posição 65 (S65G) foram selecionadas para CDR_H2 (presente em hMAB-A VH(3)), em que a numeração é de acordo com Kabat. Uma substituição de uma arginina na posição 24 (K24R) foi selecionada para CDR_L1 (presente em hMAB-A VL(3)). As substituições identificadas podem ser usadas separadamente ou em combinação.

[00304] Outros resíduos potencialmente lábeis presentes nas CDRs foram identificados (indicados com um sublinhado pontilhado nas **Figuras 3A** a **3B**), um resíduo de metionina na CDR_H1 na posição 34 (M34), um resíduo de metionina na CDR_L1 na posição 33 (M33), e re-

síduos de histidina, ácido glutâmico e ácido aspártico nas posições 92 (H93), 93 (E93), e 94 (D94), na CDR_L3, em que a numeração é de acordo com Kabat. As substituições de aminoácidos nestas posições foram examinadas como identificando substituições que mantiveram a afinidade de ligação. A substituição de isoleucina na posição 34 (M34I) foi selecionada para CDR_H1 e substituições de leucina, tirosina, serina e treonina foram selecionadas para as posições 33 (M33L), 92 (H93Y), 93 (E93S) e 94 (D94T) de CDR_L3, em que a numeração é de acordo com Kabat. Cada uma destas posições poderia ser prontamente substituída em combinação com todas as substituições detalhadas acima para render hMAB-A VH(4) e hMAB-A VL(4) que, quando pareadas juntas, geram um anticorpo que reteve uma pequena melhora em afinidade em comparação com o anticorpo murino parental, e que tem um potencial grandemente reduzido para a desamidação ou oxidação e nenhum resíduo de lisina nas CDRs.

[00305] A afinidade de ligação relativa dos anticorpos hMAB-A (1.1), hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (3.3), hMAB-A (4.4) humanizados/otimizados e o **c**hMAB-A quimérico (que tem Domínios VH/VL murinos) com huADAM foi investigada com o uso de análise BIACORE®, em que ADAM9 humana solúvel etiquetada com His ("**shADAM9-His**", que contém uma porção extracelular de ADAM9 humana fundida com uma proteína que contém histidina) foi passada sobre uma superfície revestida com anticorpo imobilizado. Brevemente, cada anticorpo foi capturado numa superfície Fc anti-humana de cabra Fab2 e, então, incubado na presença de concentrações diferentes (6,25 a 100 nM) da proteína shADAM9-His. A cinética de ligação foi determinada por meio de ligação de análise BIACORE® (modelo de ligação de Langmuir 1:1 normalizado). As k_a, k_d e K_D calculadas a partir destes estudos são apresentadas na **Tabela 3**. A ligação à cynoADAM9 foi examinada por FACS conforme descrito acima e por ELISA.

TABELA 3.

Anticorpo	pI	huADAM9		
		k_a ($x10^6$)	**k_d** ($x10^{-3}$)	**KD** (nM)
chMAB-A	6,61	1,3	4,7	3,6
hMAB-A (1.1)	6,44	1,5	5,2	3,5
hMAB-A (2.2)	6,58	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (2.3)	6,58	1,3	1,7	1,3
hMAB-A (3.3)	6,44	1,1	1,5	1,4
hMAB-A (4.4)	6,73	1,0	2,0	2,0

[00306] Os resultados destes estudos demonstram que os anticorpos humanizados/otimizados têm afinidade de ligação igual ou maior à ADAM9 humana do que o anticorpo murino parental. Em particular, foi observado que a introdução da mutação N54F nos anticorpos humanizados resultou na ligação melhorada à huADAM9 (isto é, hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), e hMAB-A (3.3)). Esta mutação também forneceu uma melhora leve na ligação à cynoADAM9 conforme determinado por FACS e ELISA, entretanto, estes anticorpos continuaram a exibir ligação insatisfatória à cynoADAM9. Estes estudos também identificaram substituições adicionais que podem ser introduzidas para remover resíduos de lisina das CDRs sem reduzir a afinidade. As substituições adicionais foram identificadas como removendo outros resíduos potencialmente lábeis com um impacto mínimo na afinidade.

EXEMPLO 4

OTIMIZAÇÃO DE LIGAÇÃO A ADAM9 DE PRIMATA NÃO HUMANO

[00307] A mutagênese aleatória foi usada para introduzir substituições nos domínios CDR_H2 (posições Kabat 53 a 58) e CDR_H3 (posições Kabat 95 a 100 e 100a a 100f) de Cadeia Pesada de hMAB-A (2.2). Os mutantes foram triados para identificar clones que têm ligação intensificada à ADAM9 de primata não humano (por exemplo,

cynoADAM9) e que reteve ligação de alta afinidade à huADAM9. 48 clones foram selecionados de duas triagens independentes de mutações em CDR_H3 (posições Kabat 100a a 100f). A **Tabela 4** fornece um alinhamento da sequência de aminoácidos de resíduos Kabat de CDR_H3 100a a 100f de clones hMAB-A (2.2) selecionados para ligação intensificada à cynoADAM9 de duas triagens independentes. Os alinhamentos de clone adicionais são fornecidos na **Tabela 5**. Conforme indicado em tais Tabelas, os clones similares surgiram em cada experimento, os quais entraram em padrões de substituição distintos.

Tabela 4

Substituições no Subdomínio da Cadeia Pesada CDRH3 de MAB-A (Posições Kabat 100a a 100f)

Triagem 1			**Triagem 2**		
ID de Clone	**SEQ ID NO**	**Sequência de Subdomínio CDR_H3**	**ID de Clone**	**SEQ ID NO**	**Sequência de Subdomínio CDR_H3**
MAB-A	81	GSRDYF	MAB-A	81	GSRDYF
1	82	DGEGVM	1	112	DGKAVL
2	82	DGEGVM	2	113	FNKAVL
3	83	FHSGLL	3	84	FNSATL
4	84	FNSATL	4	114	FNSGTW
5	85	FNSGTL	5	115	FNTGVF
6	86	FNSSTL	6	116	GKSRFH
7	87	GKSKWL	7	91	IGKGVF
8	88	GMGGTL	8	92	IGKGVL
9	89	HAKGGM	9	117	IGKNVY
10	90	IGEAVL	10	118	MGKGVM
11	91	IGKGVF	11	119	NGESVF
12	91	IGKGVF	12	120	PDFGWM
13	92	IGKGVL	13	121	PGSGVM
14	93	KHDSVL	14	122	PKDAWL
15	94	LNTAVM	15	99	PKFGWK

Triagem 1			Triagem 2		
ID de Clone	**SEQ ID NO**	**Sequência de Subdomínio CDR_H3**	**ID de Clone**	**SEQ ID NO**	**Sequência de Subdomínio CDR_H3**
16	95	NGEGTL	16	99	PKFGWK
17	96	NGKNTL	17	123	PKFGWL
18	97	NSAGIL	18	124	PKIGWH
19	98	PKEGWM	19	124	PKIGWH
20	99	PKFGWK	20	124	PKIGWH
21	100	PKMGWV	21	125	PKMGWA
22	101	PRLGHL	22	126	PKMGWM
23	102	PSFGWA	23	126	PKMGWM
24	103	QAKGTM	24	126	PKMGWM
25	104	RGMGVM	25	126	PKMGWM
26	105	RKEGWM	26	127	PQMGWL
27	106	TGKGVL	27	128	PRFGWL
28	107	TGMGTL	28	128	PRFGWL
29	108	TGNGVM	29	128	PRFGWL
30	108	TGNGVM	30	129	PRMGFL
31	109	WNAGTF	31	130	PRMGFM
32	110	YHHTPL	32	131	PSFGWM
33	110	YHHTPL	33	132	RREGWM
34	111	YQSATL	34	133	SGEGVL
			35	134	SGNGVM
			36	135	VGKAVL

Tabela 5

Substituições no Subdomínio da Cadeia Pesada CDRH3 de MAB-A (Posições Kabat 100a a 100f)

ID de Clone	**SEQ ID NO**	**Sequência de Subdomínio CDR_H3**
MAB-A **VH (2A)**	85	FNSGTL
MAB-A **VH (2B)**	92	IGKGVL
MAB-A **VH (2C)**	128	PRFGWL

ID de Clone	SEQ ID NO	Sequência de Subdomínio CDR_H3
MAB-A **VH (2D)**	106	TGKGVL
MAB-A **VH (2E)**	136	DSNAVL
MAB-A **VH (2F)**	137	FHSGTL
MAB-A **VH (2G)**	113	FNKAVL
MAB-A **VH (2H)**	138	GGSGVL
MAB-A **VH (2I)**	139	PRQGFL
MAB-A **VH (2J)**	140	YNSGTL

[00308] Para todos os clones examinados, Gly e Ala são os resíduos de aminoácido preferenciais na posição 4 (P4) e Leu, Met, e Phe são os resíduos de aminoácido preferenciais na posição 6 (P6). Os resíduos de aminoácido preferenciais nas outras posições (por exemplo, posição 2 (P2), posição 3 (P3) e posição 5 (P5)) dependem do resíduo de aminoácido encontrado em P1. Para clones que têm um resíduo Pro na posição 1 (P1), Lys e Arg foram preferenciais em P2, Phe e Met em P3, Gly em P4, e Trp ou Phe em P5. Para clones que têm uma Phe, Tyr ou Trp em P1, Asn e His foram preferenciais em P2, Ser e His em P3, e Leu em P6. Para clones que têm Ile, Leu ou Val em P1, Gly foi preferencial em P2, Lys em P3, Val em P5 e hidrofóbica em P6. Além disto, conforme pode ser visto na **Tabela 4**, para os clones que têm um resíduo Thr em P1, Gly foi preferencial em P2, Lys, Met e Asn foram preferenciais em P3, Gly foi preferencial em P4, Val ou Thr foram preferenciais em P5 e Leu e Met em P6. Os clones adicionais que têm um resíduo Asp, Gly, Arg, His ou Ser em P1 também foram identificados em frequências mais baixas (consultar **Tabela 4** e **Tabela 5**).

[00309] O Domínio VH dos dez clones mostrados na **Tabela 5** foram usados para gerar variantes otimizadas adicionais de hMAB-A (2.2) designadas hMAB-A (2A.2) a (2J.2). A ligação dos clones selecionados foi examinada por ensaio ELISA. Brevemente, os anticorpos que se ligam a peptídeos que contêm histidina e que foram revestidos

em placas de microtítulo foram usados para capturar cynoADAM9 solúvel etiquetada por peptídeo His ("**cynoADAM9-His**") (1 µg/ml) ou huADAM9 solúvel etiquetada por peptídeo His (1 µg/ml), e a ligação de diluições em série do hMAB-A parental (2.2) e as dez variantes de hMAB-A de CDR_H3 (2A.2) foram examinadas. As curvas de ligação de cynoADAM9 e huADAM9 são apresentadas na **Figura 4A** e **Figura 4B**, respectivamente. As variantes de hMAB-A (2A.2) que compreendem cada um dos Domínios VH selecionados exibiram ligação melhorada à cynoADAM9 com MAB-A VH(2B), MAB-A VH(2C), MAB-A VH(2D), e MAB-A VH(2I), que mostra a maior intensificação em ligação de cynoADAM9 enquanto se mantém a ligação similar à huADAM9 como o anticorpo de hMAB-A (2.2) parental.

[00310] A afinidade de ligação relativa dos anticorpos MAB-A VH(2B.2), MAB-A VH(2C.2), MAB-A VH(2D.2) e MAB-A VH(2I.2) humanizados/otimizados adicionais, e o hMAB-A parental (2.2), para huADAM9-His e cynoADAM9-His foi investigada com o uso de análise BIACORE® essencialmente conforme descrito acima. As k_a, k_d e K_D calculadas a partir destes estudos são apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6

Anticorpo	huADAM9			cynoADAM9		
	k_a ($x10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	**k_d** ($x10^{-4}$) (s^{-1})	KD (nM)	**k_a** ($x10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	**k_d** ($x10^{-4}$) (s^{-1})	KD (nM)
hMAB-A (2.2)	9,0	5,5	0,6	2,0	220	110
hMAB-A (2B.2)	6,1	3,9	0,6	3,4	0,66	0,2
hMAB-A (2C.2)	5,9	8,1	1,4	3,5	<0,1	<0,3
hMAB-A (2D.2)	6,9	5,8	0,8	4,2	3,0	0,7
hMAB-A (2I.2)	6,6	2,3	0,4	4,0	0,85	0,2

[00311] Os estudos de ligação demonstram que quatro clones superiores exibiram entre 150 a 550 vezes de intensificação em afinidade de ligação à cynoADAM9 enquanto se mantém a mesma ligação de

alta afinidade a huADAM9 como o anticorpo parental. hMAB-A (2C.2) e hMAB-A (2I.2) foram selecionados para estudos adicionais.

EXEMPLO 5

ESTUDO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ANTICORPO HMAB-A (2I.2)

[00312] A especificidade de célula hMAB-A (2I.2) foi investigada por IHC. As células de controle positivo e negativo e tecidos humanos e de macaco cynomolgus normais foram contatados com hMAB-A (2I.2) (2,5 µg/ml) ou um controle de isotipo (2,5 µg/ml) e a extensão de coloração foi visualizada. Os resultados do estudo são resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7		
Célula/Tecido	hMAB-A **(2I.2) (2,5 µg/ml)**	**Controle Negativo de IgG1 (2,5 µg/ml)**
Células parentais Cho-K	-	-
Expressão de meio Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional	-
Alta expressão de Cho-K/huADAM9	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K/ cynoADAM9 clone 2	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K/cynoADAM9 clone nº 16	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Células A498	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
MG06-CHTN-96 B de cólon	-	várias 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos
MG06-CHtN-162B1 A de pulmão	-	ocasional 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos
ILS11103 B de fígado	-	hepatócitos 1+ (gr c) raro a ocasional
ILS10266 de pâncreas	-	-
Heart Life Legacy 0910035D	-	células musculares cardíacas com vários focos pequenos 1-3+ de (gr c) consistentes com pigmento de lipofuscina
ILS10241 B de rim	-	epi de túbulo 1+ (gr c) raro
ILSD8011 J de bexiga	-	ocasional 2-4+ (gr c) células consistentes

		com macrófagos
Cólon Cyno nº 1	-	epi mucosal (luminal m) 2-4+ raro a ocasional e 1+ raro a ocasional; várias 2-3+ (gr c) células consistentes com macrófagos predominantemente em LP
Pulmão Cyno nº 1	-	muito raro 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos
Fígado Cyno nº 1	-	-
Pâncreas Cyno nº 1	-	-
Coração Cyno nº 1	-	-
Rim Cyno nº 070368M	-	epi de túbulo 2+ (gr c) raro e 1+ (gr c) raro a ocasional
Bexiga Cyno nº 1	epi de célula transicional ± (gr c) raro	raro 1-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos
CA de Pulmão ILS10108	Pontuação H 150	tu -
CA de Pulmão ILS7223	Pontuação H 180	tu -
CA de Pulmão ILS2156 A	Pontuação H 80	tu -
CA de Pulmão ILS7295 A	Pontuação H 60	tu -

[00313] Os estudos de IHC também foram conduzidos para avaliar a ligação de hMAB-A (2I.2) humanizado/otimizado a uma concentração de 12,5 µg/ml (5x de concentração de coloração otimizada). As células de controle positivo e negativo, e tecidos humanos e de macaco cynomolgus normais foram usados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na **Tabela 8**.

Tabela 8

Célula/Tecido	hMAB-A **(2I.2) (12,5 µg/ml)**	**Controle Negativo de IgG1 (12,5 µg/ml)**
Células parentais Cho-K	-	-
Expressão de meio Cho-K/huADAM9 P:1	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
Alta expressão de Cho-K/huADAM9	3-4+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
Cho-K/cynoADAM9 clone 2	3-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K/cynoADAM9 clone nº 16	3-4+ (gr c > m) frequente	-
Células A498	2-4+ (gr c > m) ocasional a	-

	frequente	
MG06-CHTN-96 B de cólon	epi ± - 1+ raro a ocasional	várias 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos predominantemente em LP no artigo de teste e controle negativo
MG06-CHtN-162B1 A de pulmão	células alveolares (favorecem pneumócitos) 2-3+ (gr c > m) raro, 1+ (gr c > m) raro a ocasional; EC 2-4+ (c,m) raro, 1+ (c,m) raro	dispersos ocasionais 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos no artigo de teste e controle negativo
ILS11103 B de fígado	-	dispersos ocasionais 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos no artigo de teste e controle negativo
ILS10266 de pâncreas	epi ductal 1+ (gr c > m) muito raro	células (favorecem células acinares) 1+ (gr c) muito raro; dispersos ocasionais 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos em artigo de teste e negativo
Heart Life Legacy 0910035D	-	vários focos pequenos 1-3+ coloração granular com células musculares cardíacas consistentes com pigmento de lipofuscina consistente com artefato em artigo de teste e controle negativo
ILS10241 B de rim	epi de túbulo 1+ (gr c) raro a ocasional	epi de túbulo ± (gr c) raro
ILSD8011 J de bexiga	epi de célula transicional 1+ (gr c) raro	raro 2-4+ (gr c) células consistentes com macrófagos em artigo de teste e controle negativo
Cólon Cyno nº 1	-	epi mucosal (luminal m) 2-4+ ocasional e 1+ raro a ocasional
Pulmão Cyno nº 1	epi brônquico 1+ (gr c > m) raro a ocasional e ± (gr c > m) ocasional a frequente	-
Fígado Cyno nº 1	-	-
Pâncreas Cyno nº 1	-	-
Coração Cyno nº 1	-	-
Rim Cyno nº 070368M	-	epi de túbulo 1+ (gr c) raro e ± (gr c) raro
Bexiga Cyno nº 1	epi de célula transicional 2+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m)	-

	raro a ocasional	
CA de Pulmão ILS10108	Pontuação H 180	tu -
CA de Pulmão ILS7223	Pontuação H 180	tu -
CA de Pulmão ILS2156 A	Pontuação H 115	tu -
CA de Pulmão ILS7295 A	Pontuação H 115	tu -

[00314] Um estudo de IHC comparativa foi conduzido a fim de avaliar diferenças em ligação por hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2), e hMAB-A (2I.2) em 2,5 µg/ml ou 5 µg/ml. As células de controle positivo e negativo, e tecidos humanos e de macaco cynomolgus normais foram usados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na **Tabela 9**.

Tabela 9					
Tecido	hMAB-A (2.3) **5 ug/ml**	hMAB-A (2.2) **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2C.2)** **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2I.2)** **2,5 µg/ml**	**Controle de isotipo** **5 µg/ml**
Cho-K parental P:3	-	-	-	-	-
Expressão de meio Cho-K/hu ADAM9.2 P:1	1+ (c) ocasional	2-4+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) raro a ocasional	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) raro a ocasional	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional	-
Alta expressão de Cho-K/hu ADAM9.18 P:1	3+ (m,c) frequente	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente e 1+ (gr c > m) ocasional	2-4+ (gr c > m) ocasional a frequente e 1+ (gr c > m) ocasional	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K Cyno nº 2	1+ (c) ocasional	-	3-4+ (gr c > m) frequente	2-4+ (gr c > m) frequente	-
Cho-K Cyno nº 16	2+ (c,m) ocasional a frequente	2-4+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) raro a ocasional	3-4+ (gr c > m) frequente	2-4+ (gr c > m) frequente	-
A498 072210	3-4+ (c,m) frequente	2-4+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	2-4+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) ocasional	2-4+ (gr c > m) raro a ocasional e 1+ (gr c > m) ocasional a frequente	-
CA de Pulmão ILS10108	Pontuação de IHC 3	Pontuação H 55	Pontuação H 17	Pontuação H 150	-
CA de Pulmão ILS7223	Pontuação de IHC 3	Pontuação H 205	Pontuação H 160	Pontuação H 180	-
CA de Pulmão ILS2156 A	Pontuação de IHC 1	Pontuação H 5	Pontuação H 0	Pontuação H 80	-
CA de Pulmão ILS7295 A	Pontuação de IHC 1	Pontuação H 1	Pontuação H 0	Pontuação H 60	-

[00315] Um estudo de IHC comparativa adicional foi conduzido a fim de avaliar diferenças em ligação por hMAB-A (2.2), hMAB-A (2.3), hMAB-A (2C.2), e hMAB-A (2I.2) e MAB-A murino em 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ou 12,5 µg/ml. As células

Petição 870210021727, de 08/03/2021, pág. 193/301

de controle positivo e negativo, e tecidos humanos e de macaco cynomolgus normais foram usados neste estudo. Os resultados do estudo são resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10

Tecido	hMAB-A (2.3) **5 ug/ml**	hMAB-A (2.2) **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2C.2)** **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2I.2)** **12,5 µg/ml**	MAB-A **5 µg/ml**
Cólon MG06-CHTN-96 B	epi 1+ (c,m) raro; sm negativo	-	-	epi ± - 1+ raro a ocasional	Epitélio 1-3+ [m, c] (ocasional a frequente); Outros (Neg)
Pulmão MG06-CHtN-162B1 A	pneumócitos/macrófagos 2+ (c,m) ocasional	-	-	células alveolares (favorecem pneumócitos) 2-3+ (gr c > m) raro, 1+ (gr c > m) raro a ocasional; EC 2-4+ (c,m) raro, 1+ (c,m) raro	Monócitos 1+ [c] (raro a ocasional); Outros (Neg)
Fígado ILS11103 B	hepatócitos 1+ (c) raro a ocasional	hepatócitos 1+ (gr c) frequente	hepatócitos 2+ (gr c) raro e 1+ (gr c) frequente	-	Células de Kupffer 3+ [c] (ocasional); Outros (Neg)
Pâncreas ILS10266	epi 1+ (c) raro; Células de Ilhotas 1+ (c) muito raro	-	-	epi ductal 1+ (gr c > m) muito raro	Epitélio ductal 1-2+ [c, m] (raro a ocasional); Fibrila 2+ (raro); Outros (Neg)
Heart Life Legacy 0910035D	±	-	-	-	Neg
ILS10241 B de rim	epi 2-3+ (c,m) frequente	epi de túbulo 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) ocasional a frequente	epi de túbulo 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) ocasional a frequente	epi de túbulo 1+ (gr c) raro a ocasional	Epitélio 1+ [c] (raro); Outros (Neg)
Bexiga	epi transicional 1+ (c	-	-	epi de célula transicional 1+ (gr c)	Epitélio transicional 2+ [c,

Petição 870210039440, de 30/04/2021, pág. 169/304

Petição 870210021727, de 08/03/2021, pág. 194/301

Tecido	hMAB-A (2.3) **5 ug/ml**	hMAB-A (2.2) **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2C.2)** **2,5 µg/ml**	hMAB-A **(2I.2)** **12,5 µg/ml**	MAB-A **5 µg/ml**
ILSD8011 J	) raro a ocasional			raro	m] (ocasional a frequente); Células estromais 3+ [c] (raro); Outros (Neg)
Cólon Cyno nº 1	epi 1+ (c,m) raro	-	-	-	
Pulmão Cyno nº 1	Macrófago e pneumócitos 1+ (c) muito raro	-	epi brônquico 3-4+ (gr c) raro, 2+ (gr c) ocasional, e 1+ (gr c) ocasional	epi brônquico 1+ (gr c > m) raro a ocasional e ± (gr c > m) ocasional a frequente	
Fígado Cyno nº 1	hepatócitos 1+ (c) frequente	hepatócitos 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) raro a ocasional	hepatócitos 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) ocasional; epi ductal 1+ (gr c) ocasional	-	
Pâncreas Cyno nº 1	epi e células de ilhota 1+ (c) muito raro	-	células de ilhota ± (gr c) frequente; epi ductal 1+ (gr c) raro a ocasional	-	positivo
Coração Cyno nº 1	miocárdio 1+ (c) frequente	-	-	-	
Rim Cyno nº 070368M	epi 2+ (c) frequente	epi de túbulo 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) raro a ocasional	epi de túbulo 2+ (gr c) raro a ocasional e 1+ (gr c) ocasional a frequente	-	positivo
Bexiga Cyno nº 1	epi transicional ± (c); macrófagos muito raro	-	epi de célula transicional 2-3+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) ocasional	epi de célula transicional 2+ (gr c > m) raro e 1+ (gr c > m) raro a ocasional	

Petição 870210039440, de 30/04/2021, pág. 170/304

[00316] Deste modo, os resultados demonstram que hMAB-A (2.2) exibiu uma coloração de baixo nível geral de hepatócitos humanos e túbulos de rim em concentração otimizada, com uma intensidade de coloração/frequência de reatividade mais baixa em hepatócitos e túbulos de rim observados no controle negativo. hMAB-A (2.2) exibiu coloração de baixo nível similar de hepatócitos cyno e túbulos de rim em concentração otimizada, com intensidade de coloração/frequência de reatividade mais baixa em túbulos de rim observada no controle negativo.

[00317] Os resultados também demonstram que hMAB-A (2C.2) exibiu uma coloração de baixo nível geral de hepatócitos humanos e túbulos de rim em concentração otimizada, com intensidade de coloração/frequência de reatividade mais baixa em hepatócitos e túbulos de rim observados no controle negativo. hMAB-A (2C.2) exibiu coloração de baixo nível similar em hepatócitos cyno e túbulos de rim em concentração otimizada. Constatações mínimas adicionais em epitélio de pulmão cyno, ilhotas pancreáticas/epitélio e epitélio de bexiga para hMAB-A (2C.2) não foram observadas no tecido humano correspondente; intensidade de coloração/frequência de reatividade mais baixa foi observada em epitélio de pulmão, túbulos de rim, epitélio de bexiga em controle negativo. Os resultados também demonstram que hMAB-A (2I.2) não exibiu coloração de tecidos humanos ou cyno em concentração otimizada, com coloração de epitélio de célula de transição de bexiga +/- rara. hMAB-A (2I.2) também exibiu baixo nível geral e coloração de frequência de alveolares de pulmão humano, epitélio ductal de pâncreas, túbulo de rim, epitélio de célula transicional de bexiga em 5x de concentração otimizada, e coloração de baixo nível geral de epitélio brônquico cyno e epitélio de célula transicional de bexiga em 5x de concentração otimizada. hMAB-A (2I.2) exibe um perfil de IHC favorável geral nos tecidos normais humanos testados e um perfil similar

em tecidos de macaco cynomolgus correspondentes.

EXEMPLO 6

HMAB-A (2I.2) QUE COMPREENDE REGIÕES FC VARIANTES

[00318] hMAB-A(2I.2) compreende uma cadeia leve (**SEQ ID NO:68**) que tem uma região constante de cadeia leve kappa e uma cadeia pesada (**SEQ ID NO:52**) que tem regiões constantes de cadeia pesada de IgG de tipo selvagem. As variantes Fc foram geradas introduzindo-se as seguintes substituições na Região Fc: L234A/L235A (consultar, por exemplo, **SEQ ID NO: 78**) designada hMAB-A (2I.2) (AA); S442C (consultar, por exemplo, **SEQ ID NO: 79**) designada hMAB-A (2I.2)(C); e L234A/L235A/S442C (consultar, por exemplo, **SEQ ID NO: 80**) designada hMAB-A (2I.2)(AA/C). A ligação de cada variante Fc a huADAM9-His e cynoADAM9-His foi examinada por ensaio ELISA. Brevemente, os anticorpos que se ligam a peptídeos que contêm histidina e que foram revestidos em placas de microtítulo foram usados para capturar cynoADAM9 solúvel etiquetada por peptídeo His ou huADAM9 solúvel etiquetada por peptídeo His (0,5 µg/ml), e a ligação de diluições em série do hMAB-A parental (2.2) e das variantes Fc foi examinada. As curvas de ligação de huADAM9 e cynoADAM9 são apresentadas na **Figura 5A** e na **Figura 5B**, respectivamente, e mostram que cada uma dentre as variantes Fc reteve a afinidade de ligação de hMAB-A (2I.2) que tem uma região Fc de tipo selvagem.

EXEMPLO 7

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ALVO

[00319] Para avaliar a expressão de ADAM9 através de indicações diferentes, um microarranjo de tecido (TMA) com 20 tipos de tumor diferentes foi primeiro avaliado com o uso de um ensaio de IHC de ADAM9 desenvolvido em ImmunoGen para uso de pesquisa preliminar.

[00320] Todas as amostras analisadas foram amostras de FFPE

(fixadas em formalina e embebidas em parafina). O TMA de 20 carcinomas de 500 núcleos foi adquirido a partir de Folio Biosciences (nº de cat. ARY-HH0212). O NSCLC TMA com 80 núcleos para adenocarcinoma e 80 núcleos para carcinoma de células escamosas foi adquirido a partir de US Biomax (nº de cat. LC1921A). O TMA de câncer colorretal com 80 núcleos para adenocarcinoma foi adquirido a partir de Pantomics Inc. (nº de cat. COC1261). As amostras de câncer gástrico foram adquiridas a partir de Avaden Biosciences.

[00321] A coloração imuno-histoquímica para ADAM9 foi executada com o uso do equipamento de coloração automática Ventana Discovery Ultra. O anticorpo primário para ADAM9 foi um anticorpo monoclonal de coelho comercialmente disponível. Todas as amostras foram avaliadas e pontuadas por um patologista certificado por conselho treinado no algoritmo de pontuação. A presença de pelo menos 100 células tumorais viáveis foi necessária para pontuação. A intensidade de coloração foi pontuada numa escala de números inteiros semiquantitativa de 0 a 3, com 0 representando sem coloração, 1 representando coloração fraca, 2 representando coloração moderada e 3 representando coloração forte. A porcentagem de coloração de células positivamente em cada nível de intensidade foi registrada. A pontuação teve base na localização de Adam9 apenas à membrana de célula, assim como a avaliação de localização tanto para o citoplasma quanto para a membrana. Os resultados de coloração foram analisados pela pontuação H, que combina os componentes de intensidade de coloração com a porcentagem de células positivas. Os mesmos têm um valor entre 0 e 300 e são definidos como:

1 * (porcentagem de coloração de células em intensidade 1+)

+ 2 * (porcentagem de coloração de células em intensidade 2+)

+ 3 * (porcentagem de coloração de células em intensidade 3+)

= pontuação H.

[00322] O TMA de 20 carcinomas de 500 núcleos com 5 controles de tecido normal para cada tipo de tumor foi colorido e pontuado de duas maneiras diferentes: (1) com base somente na coloração de membrana ou (2) com base na coloração de membrana e citoplásmica. A Tabela 11 abaixo e a Figura 6A resumem a prevalência de ADAM9 com base na coloração de membrana para todas as vinte indicações e a Tabela 12 e a Figura 6B resumem os resultados de coloração de membrana e citoplásmica para oito indicações selecionadas.

[00323] Com base nos resultados do TMA de múltiplos carcinomas, três indicações para uma análise de prevalência expandida foram escolhidas: câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer colorretal (CRC) e câncer gástrico. Para NSCLC, um TMA com 80 núcleos para adenocarcinoma e 80 núcleos para carcinoma de células escamosas foi colorido e avaliado. Para CRC, um TMA com 80 núcleos para adenocarcinoma foi analisado, dos quais 78 foram avaliáveis. Para câncer gástrico, 15 seções de tecido total de adenocarcinoma foram analisadas. Todas estas amostras foram pontuadas para coloração de membrana e citoplásmica, e os resultados são resumidos na Tabela 13. Os resultados destes estudos preliminares mostram que ADAM9 é expressa numa ampla gama de cânceres sólidos e suporta o uso de conjugados de fármaco anti-ADAM9 em muitos tumores sólidos de expressão de ADAM9 diferentes.

TABELA 11: PREVALÊNCIA DE ADAM9 EM 20 INDICAÇÕES DIFERENTES COM BASE EM COLORAÇÃO DE MEMBRANA

Tipo de tumor	**% de positivos (Pontuação H >=1)**	**Pontuação H: 1 a 100**	**Pontuação H: 101 a 200**
Pâncreas (n=17)	95%	24%	71%
Útero (n=18)	89%	67%	22%
Tireoide (n=17)	88%	88%	0%
Rim (n=17)	88%	59%	29%
Testículo (n=17)	83%	65%	18%

Tipo de tumor	% de positivos (Pontuação H >=1)	Pontuação H: 1 a 100	Pontuação H: 101 a 200
Próstata (n=20)	80%	45%	35%
Cólon (n=16)	76%	38%	38%
Bexiga (n=16)	76%	63%	13%
Mama (n=20)	75%	65%	10%
Cérebro (n=19)	68%	63%	5%
Estômago (n=17)	59%	24%	35%
Pulmão (n=19)	58%	58%	0%
Esôfago (n=19)	43%	32%	11%
Colo do útero (n=20)	40%	40%	0%
Ovário (n=18)	39%	33%	6%
Cabeça e Pescoço (n=20)	35%	30%	2%
Fígado (n=19)	32%	32%	0%
Pele (n=20)	10%	10%	0%
Tecido Mole (n=20)	0%	0%	0%
Linfoma (n=20)	0%	0%	0%

TABELA 12: PREVALÊNCIA DE ADAM9 EM 8 INDICAÇÕES SELECIONADAS COM BASE EM COLORAÇÃO DE MEMBRANA E CITOPLÁSMICA

Tipo de tumor	% de positivos (Pontuação H >=1)	Pontuação H: 1 a 100	Pontuação H: 101 a 200	Pontuação H: 201 a 300
Cólon	100%	31%	63%	6%
Pulmão	100%	58%	42%	0%
Pâncreas	100%	18%	76%	6%
Próstata	95%	25%	55%	15%
Esôfago	95%	58%	37%	0%
Estômago	94%	18%	71%	6%
Mama	70%	50%	20%	0%
Ovário	61%	44%	17%	0%

TABELA 13: PREVALÊNCIA DE ADAM9 EM AMOSTRAS ADICIONAIS PARA NSCLC, CRC E CÂNCER GÁSTRICO COM BASE NA COLORAÇÃO DE MEMBRANA E CITOPLÁSMICA

Tipo de Tumor	Número de Amostras	% de positivos (Pontuação H >=1)	Distribuição de Pontuação H		
			1 a 100	101 a 200	201 a 300
Adenocarcinoma de NSCLC	80	90%	46%	39%	5%
NSCLC Escamosas	80	81%	65%	13%	3%
Adenocarcinoma de CRC	78	91%	51%	41%	0%
Adenocarcinoma Gástrico	15	100%	27%	53%	20%

EXEMPLO 8

ESTUDOS DE INTERNALIZAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-ADAM9

[00324] Para avaliar a internalização dos anticorpos anti-ADAM9 da invenção, experimentos de internalização com base em citometria de fluxo foram realizados em anticorpos hMAB-A(2.2), hMAB-A(2I.2), e hMAB-A(2I.2)-S442C conjugados com Alexa Fluor 488.

[00325] Os conjugados de anticorpo Alexa488 Anti-ADAM9 para hMAB-A(2.2), hMAB-A(2I.2), hMAB-A(2I.2)-S442C foram gerados com o uso de éster de tetrafuorofenila Alexa Fluor 488 de acordo com as instruções do fabricante (Thermofisher). Os conjugados foram eluídos em PBS livre de azida de sódio, pH 7,2 para possibilitar os ensaios de internalização. A concentração e o grau de identificação foram calculados a partir de medições de absorção em 280 nm e 494 nm. Os ensaios de ligação FACS foram realizados para garantir que a identificação de Alexa488 não afete de modo adverso a ligação-alvo.

[00326] A internalização de conjugados anti-ADAM9-Alexa488 foi determinada seguindo tanto a exposição contínua quanto de pulso aos conjugados fluorescentes. Para experimentos contínuos, as células

NCI-H1703 foram tratadas com uma concentração de saturação do anticorpo identificado por Alexa488 indicado em gelo ou a 37°C pelo tempo inteiro indicado. Enquanto isto, para experimentos de pulso, os conjugados anti-ADAM9-Alexa488 foram sido pré-ligados às células em gelo e o conjugado em excesso removido por lavagem antes do deslocamento a 37°C e internalização de monitoramento. Nos pontos no tempo indicados após exposição contínua ou de pulso, as células foram elevadas com verseno (Thermofisher) e lavadas com PBS frio duas vezes, e poços de replicação foram ressuspensos em PBS frio sem (amostras não bruscamente arrefecidas) ou com anticorpo anti-A488 300 nM (amostras bruscamente arrefecidas). Todas as amostras foram incubadas por 30 m em gelo. As células foram, então, granuladas, fixadas em paraformaldeído 1% e analisadas por citometria de fluxo. A fluorescência de células incubadas em gelo por 30 minutos e, então, incubadas com anticorpo anti-Alexa488 representa a fração fluorescente não bruscamente arrefecível e foi subtraída de todas as outras amostras antes de calcular a internalização. A porcentagem de internalização foi calculada como fluorescência de amostras bruscamente arrefecidas corrigidas por arrefecimento brusco de superfície incompleto (fluorescência intracelular) dividido por aqueles de células não bruscamente arrefecidas (fluorescência total). Foi feito o gráfico de internalização de conjugados de anticorpo anti-ADAM9 e os dados foram adaptados com o uso de uma equação de decaimento exponencial de fase única (GraphPad Prism, ver. 5.01).

[00327] A internalização de anticorpos anti-ADAM9 identificados por Alexa488 ligados em superfície foi avaliada após tanto o tratamento de pulso quanto contínuo em células NCI-H1703. Todos os três conjugados anti-ADAM9-Alexa488 testados mostraram internalização rápida, com ~39% dos conjugados internalizados nos primeiros 15 minutos e um total de ~77% internalizados após 6 horas (Figura 7A). De modo

interessante, após a exposição contínua por 24 horas, o sinal fluorescente internalizado foi ~7 vezes maior do que o sinal fluorescente inicial total ligado à superfície de célula após 30 minutos (Figura 7B). Deste modo, ADAM9 é provavelmente recarregada na superfície de célula de um agrupamento intracelular durante incubações a 37°C, permitindo múltiplas vezes de internalização de conjugado de anticorpo anti-ADAM9. A eficácia de imunoconjugados anti-ADAM9 depende da internalização, tráfego intracelular e degradação dos imunoconjugados. A potência de imunoconjugados anti-ADAM9 pode ser, em parte, explicada pela alta internalização de imunoconjugados anti-ADAM9 que leva provavelmente à geração de altas quantidades de catabólicos citotóxicos.

EXEMPLO 9

ESTUDOS DE PROCESSAMENTO DE CÉLULA DE ANTICORPO ANTI-ADAM9

[00328] Para avaliar a ligação-alvo em célula, a ingestão e a degradação lisossômica de chMAB-A, um método de processamento de anticorpo identificado por ^{3}H-propionamida anteriormente descrito foi usado (Lai *et al*., Pharm Res. novembro de 2015; 32(11):3593-3603). Com o uso deste método, o anticorpo chMAB-A de alvejamento de ADAM9 foi identificado por traço com propionato tritiado por meio de resíduos de lisina. Foi anteriormente mostrado que, mediante ligação, ingestão e tráfego celular para o lisossomo, Ab identificado por [^{3}H]propionato (^{3}H-Ab) é degradado e lisina-[^{3}H]propionamida é liberado no meio de crescimento celular. A adição de solvente orgânico precipita o anticorpo identificado intacto e deixa a lisina-[^{3}H]propinoamida em solução, permitindo a medição conveniente e precisa da extensão de processamento de anticorpo.

[00329] chMAB-A foi identificado com [^{3}H]-propionato, conforme anteriormente descrito. A linha de NSCLC, NCI-H1703, e a linha de CRC,

DLD-1, foram tratadas com anticorpo ^{3}H-chMAB-A 10 nM após a determinação de saturação de antígeno por meio da curva de ligação. Algumas amostras de células foram tratadas com o anticorpo de controle de isotipo tritiado não-alvo, ^{3}H-chKTI, enquanto outros foram não tratados. As células foram transferidas para placa e cultivadas de um dia para o outro em placas de 6 poços e, então, tratadas por pulso com reagente (ou reagentes) conforme anteriormente descrito. Brevemente, as células foram incubadas com anticorpo ^{3}H-chMAB-A ou ^{3}H-chKTI por 20 minutos antes da lavagem 3 vezes em meios frescos. As células foram incubadas de um dia para o outro a 37°C com CO_2 5%. Após uma incubação de 20 a 24 horas, as células foram colhidas e a proteína precipitada com volume de 4:3 de mistura acetona:meios/ célula. As amostras foram congeladas a -80°C por um mínimo de 1 hora antes do descongelamento e separação por centrífuga. Os péletes foram tratados para solubilizar a proteína antes da contagem por 5 minutos em um contador de cintilação de líquido Tri-Carb (LSC). Pelo protocolo do fabricante, 1 ml de SOLVABLE (Perkin Elmer) foi adicionado a cada amostra de grânulo e incubado em um banho de água a 50°C de um dia para o outro. As amostras foram removidas do banho de água, transferidas para frascos de cintilação de vidro de 20 ml e EDTA e H_2O_2 foram adicionados a amostras seguidas por 1 hora adicional de incubação a 50°C. As amostras foram bruscamente arrefecidas com HCl, 15 ml de fluido de cintilação de líquido Optima Gold (Perkin Elmer) foram adicionados, e as amostras foram submetidas a vórtice cuidadosamente. As amostras foram mantidas no escuro por um mínimo de 4 horas antes da contagem por LSC. As amostras de extrato de acetona livre de proteína foram secadas para volumes <1 ml sob vácuo e processadas com o uso de Solvable conforme descrito acima antes de LSC. A quantidade de anticorpo identificado ligado, degradado e intacto foi calculada a partir dos valores de CPM de amostra re-

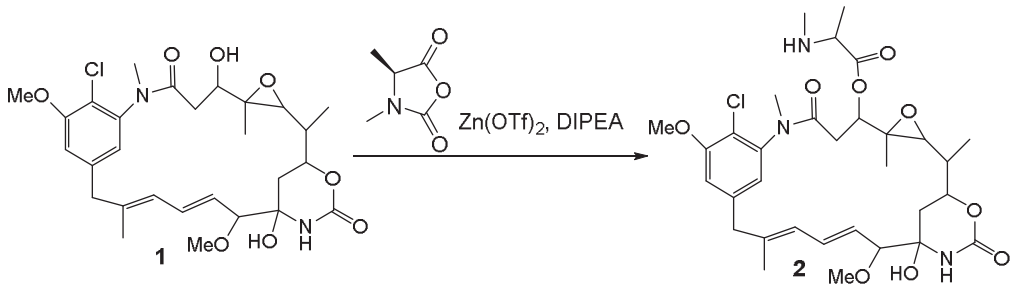
sultantes.

[00330] O nível de processamento de ^{3}H-chMAB-A anticorpo foi determinado após o tratamento de pulso e incubação de um dia para o outro a 37°C. As células NCI-H1703 mostraram 93% de ^{3}H-chMAB-A processado dentro de 24 horas, e as células DLD-1 mostraram 92% de ^{3}H-chMAB-A processados no mesmo período de tempo. A ligação e o processamento de ^{3}H-chKTI foi negligenciável (CPM total >100 vezes mais baixo em relação ao anticorpo alvejado). Os valores de processamento para estas linhas celulares são altos, especialmente em comparação com os valores de processamento de pulso de 24 horas anteriormente relatados para outros alvos/anticorpos ADC que suportam os anticorpos anti-ADAM9 da invenção como conjugados de fármaco eficazes.

EXEMPLO 10.

SÍNTESE DE DERIVADOS MAITANSINOIDES DA INVENÇÃO

EXEMPLO 10A. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE ESTOQUE DM-H (7)



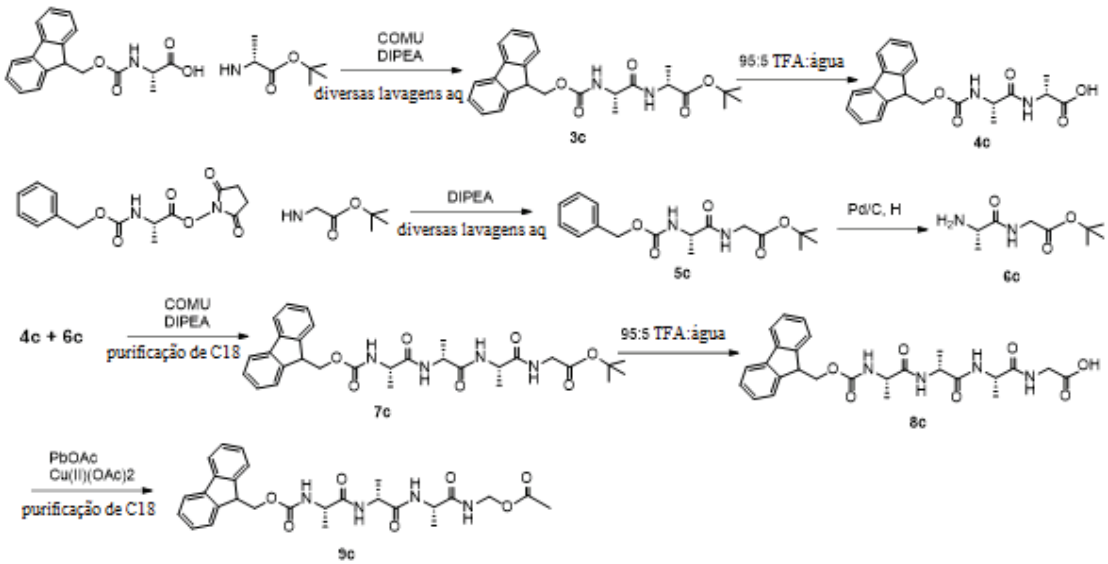
[00331] Maitansinol (5,0 g, 8,85 mmol) foi dissolvido em DMF anidro (125 ml), então, resfriado em um banho de gelo. O N-carboxi anidrido de N-metil alanina (5,7 g, 44,25 mmol), DIPEA anidra (7,70 ml, 44,25 mmol) e trifluorometano sulfonato de zinco (22,5 g, 62 mmol) foram, então, adicionados com agitação magnética sob uma atmosfera de argônio. O banho de gelo foi removido e permitiu-se que a reação se aquecesse com agitação. Após 16 h, água deionizada (10 ml) foi adicionada. Após 30 min, uma solução 1:1 de bicarbonato de sódio aquoso saturado : cloreto de sódio aquoso saturado (190 ml) e acetato de

etila (250 ml) foi adicionada com agitação vigorosa. A mistura foi transferida para um funil separador e a camada orgânica foi retida. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila (100 ml), então, as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com cloreto de sódio aquoso saturado (50 ml). A camada orgânica foi concentrada para aproximadamente 1/4 de seu volume por evaporação rotativa sob vácuo sem aquecer o banho de evaporador, nenhuma purificação foi conduzida. A concentração da solução foi estimada dividindo-se os mmoles de maitansinol usados na reação (1,77 mmol) pelo volume (150 ml) gerando solução de estoque DM-H (0,06 mmol/ml). As alíquotas da solução de estoque foram imediatamente dispensadas, então, usadas em reações ou armazenadas em um congelador a -80C, então, descongeladas quando necessário.

EXEMPLO 10B. SÍNTESE DE TIO-PEPTÍDEO-MAITANSINOIDES

1. COMPOSTOS FMOC-PEPTÍDEO-NH-CH_2-OAC (COMPOSTOS 9A A 9J)

SÍNTESE DE FMOC-L-ALA-D-ALA-L-ALA-NH-CH_2-OAC (9C):



ETAPA 1: FMOC-L-ALA-D-ALA-OTBU (3C):

[00332] FMoc-L-alanina (10 g, 32,1 mmol) e D-Ala-OtBu, HCl (7,00 g, 38,5 mmol) foram dissolvidos em CH2Cl2 (100 ml), tratados com COMU (20,63 g, 48,2 mmol) e DIPEA (11,22 ml, 64,2 mmol). Permitiu-

se que a reação avançasse sob argônio à temperatura ambiente. Após 2 horas, a reação mostrou conclusão por UPLC, foi diluída com 2-MeTHF (50 ml), lavada com ácido cítrico aquoso 10% (2 x 100 ml), água (100 ml), seguido por salmoura (100 ml). A camada orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada para render FMoc-L-Ala-D-Ala-OtBu bruto, supondo 100% de rendimento.

ETAPA 2: FMOC-L-ALA-D-ALA (4C)

[00333] FMoc-LAla-DAla-OtBu (11,25 g, 25,7 mmol) foi tratado com TFA:Água (95:5) (50 ml). Permitiu-se que a reação avançasse à temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. Após 4 horas, a reação mostrou conclusão por UPLC, foi diluída com tolueno (25 ml) e coevaporada 3x para render FMoc-L-Ala-D-Ala, supondo 100% de rendimento.

ETAPA 3: FMOC-L-ALA-GLY-OTBU (5C)

[00334] Z-L-Ala-ONHS (10 g, 31,2 mmol) e glicinato de terc-butila (6,28 g, 37,5 mmol) foram dissolvidos em CH2Cl2 (100 ml), tratados com DIPEA (10,91 ml, 62,4 mmol). Permitiu-se que a reação avançasse sob argônio à temperatura ambiente. Após 2 horas, UPLC mostrou conclusão, a reação foi diluída com 2-MeTHF (50 ml), lavada com ácido cítrico aquoso 10% (100 ml), bicarbonato de sódio saturado (2x100 ml), água (100 ml), salmoura (100 ml). A camada orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada para render Z-L-Ala-Gly-OtBu, supondo 100% de rendimento.

ETAPA 4. L-ALA-GLY-OTBU (6C)

[00335] Z-Ala-Gly-OtBu (10,05 g, 29,9 mmol) foi dissolvido em MeOH:Água 95:5 (50 ml), transferido para um frasco hidrogenador, tratado com Pd/C (1,272 g, 11,95 mmol). O frasco hidrogenador foi colocado no agitador, o ar foi removido a vácuo enquanto o frasco foi agitado. O frasco carregado com hidrogênio a 0,21 MPa (30 psi), o frasco foi agitado por 2 minutos e o hidrogênio foi removido a vácuo. Isto foi

repetido 2 vezes adicionais. Permitiu-se que o hidrogênio carregasse o frasco a 0,21 MPa (30 psi) e que o mesmo fosse agitado. Após 4 h, UPLC mostrou conclusão, a reação foi filtrada através de um plugue de celite, *in vacuo*, dissolvida novamente em 2-MeTHF, concentrada para render LAla-Gly-OtBu, supondo 100% de rendimento.

ETAPA 5: FMOC-L-ALA-D-ALA-L-ALA-GLY-OTBU (7C)

[00336] FMoc-LAla-D-ALa-OH (0,959 g, 2,508 mmol) e L-Ala-Gly-OtBu (0,718 g, 3,01 mmol) foram dissolvidos em CH2Cl2 (10 ml), tratados com COMU (1,181 g, 2,76 mmol) e DIPEA (0,876 ml, 5,02 mmol). Permitiu-se que a reação avançasse sob argônio à temperatura ambiente. Após 2 horas a reação mostrou conclusão. A reação foi concentrada para remover CH2Cl2, dissolvida novamente em 2 ml de DMF e purificada por C18 combiflash com o uso de um gradiente linear, o produto foi combinado para render FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OtBu (660 mg, 46% de rendimento).

ETAPA 6. FMOC-L-ALA-D-ALA-L-ALA-GLY-OH (8C)

[00337] FMoc-LAla-DAla-LAla-GlyOtBu (200 mg, 0,353 mmol) foi tratado com TFA: Água (95:5) (2 ml). Permitiu-se que a reação avançasse sob argônio à temperatura ambiente. Após 1 h, a reação mostrou conclusão por UPLC. O produto bruto foi diluído com tolueno (1 ml), coevaporado 2x com tolueno para render FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OH, supondo 100% de rendimento.

ETAPA 7. FMOC-L-ALA-D-ALA-L-ALA-CH_2-OAC (9C)

[00338] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OH (2,65 g, 5,19 mmol) foi dissolvido em DMF (20 ml), tratado com acetato de cobre (II) (0,094 g, 0,519 mmol) e ácido acético (0,446 ml, 7,79 mmol). Uma vez que todos os reagentes foram dissolvidos, a reação foi tratada com tetra-acetato de chumbo (3,45 g, 7,785 mmol). Permitiu-se que a reação avançasse sob argônio a 60°C por 30 minutos. A reação bruta foi purificada por meio de Combiflash Rf 200i com o uso da coluna C18 de

450 g com uma taxa de fluxo de 125 ml/min com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e acetonitrila como solventes com o uso de um gradiente conforme a seguir (tempo em minutos, porcentagem de acetonitrila) (0,5) (8,50) (26, 55). O produto desejável que tem um tempo de retenção de 11 minutos, as frações de produto foram imediatamente congeladas e liofilizadas para render FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH2-OAc (843 mg, 1,607 mmol, 31,0% de rendimento). HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 547,2163, encontrado 547,2167. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,23 (dd, J = 12,5, 7,4 Hz, 9H), 1,95 (s, 2H), 4,00 – 4,13 (m, 1H), 4,17 – 4,38 (m, 6H), 5,06 (q, J = 8,8 Hz, 2H), 7,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,42 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,71 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 7,85 – 8,01 (m, 3H), 8,21 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 8,69 (d, J = 6,9 Hz, 1H).

[00339] Os seguintes compostos do tipo FMoc-Peptídeo-NH-CH_2-OAc foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e conforme exemplificado para FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-OAc (9c) acima.

[00340] **FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-OAc (9a):** FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-Gly-OH (SEQ ID NO:163) (500 mg, 0,979 mmol) foi dissolvido em DMF (2 ml), ao qual foi adicionado acetato de cobre (II) (17,8 mg, 0,098 mmol) e ácido acético (84 µl, 1,47 mmol) com agitação magnética sob argônio. Uma vez que os sólidos foram dissolvidos, tetra-acetato de chumbo (434 mg, 0,979 mmol) foi adicionado. Permitiu-se que a reação avançasse a 60°C por 20 min, então, foi purificada em um cartucho de coluna C18 de 450 g, de 30 mícrons, em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente de acetonitrila linear de 5% a 55% por 26 min a uma taxa de fluxo de 125 ml/min. As frações que contêm o produto desejável puro foram congeladas e liofilizadas para gerar 178 mg (34% de rendimento) de um sólido branco. HRMS $(M + Na)^+$ calcd. 547,2163; encontrado 547,2160. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 1,20 (qd, *J* = 7,5, 6,9, 4,2 Hz, 9H),

1,91 – 2,05 (m, 3H), 3,26 – 3,38 (m, 1H), 4,05 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H), 4,23 (td, *J* = 11,9, 10,7, 6,4 Hz, 5H), 5,07(ddd, *J* = 11,2, 6,9, 4,3 Hz, 2H), 7,32 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,41 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,52 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,71 (q, *J* = 7,5, 7,0 Hz, 2H), 7,82 – 8,08 (m, 4H), 8,84 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H).

[00341] **FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-OAc (9b):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 547,2163, encontrado 547,2167. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,23 (dd, *J* = 12,5, 7,4 Hz, 9H), 1,95 (s, 2H), 4,00 – 4,13 (m, 1H), 4,17 – 4,38 (m, 6H), 5,06 (q, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,33 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,62 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,71 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,85 – 8,01 (m, 3H), 8,21 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 8,69 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H).

[00342] **FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-OAc (9d):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 547,2163, encontrado 547,2167. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,18 – 1,25 (m, 9H), 1,97 (s, 3H), 3,96 – 4,15 (m, 1H), 4,17 – 4,36 (m, 5H), 5,09 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 7,34 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,57 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,90 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 8,07 (s, 2H), 8,86 (s, 1H).

[00343] **FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-OAc (9f):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 476,1792, encontrado 476,1786. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,13 (dd, *J* = 7,1, 1,4 Hz, 6H), 1,89 (s, 3H), 3,99 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,10 – 4,29 (m, 4H), 4,95 – 5,08 (m, 2H), 7,26 (t, *J* = 7,4, 1,3 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,49 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,66 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 8,11 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,76 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H).

[00344] **FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-OAc (9g):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 476,1792, encontrado 476,1788. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,21 (dd, *J* = 7,1, 1,4 Hz, 6H), 1,96 (s, 3H), 4,08 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,17 – 4,36 (m, 4H), 5,05 – 5,14 (m, 2H), 7,26 – 7,38 (m, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,73 (t, *J* = 7,6 Hz,

2H), 7,90 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 8,18 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,83 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H).

[00345] **FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-OAc (9h):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 455,4877, encontrado 455,2051 RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,14 (dd, *J* = 7,1, 3,3 Hz, 6H), 1,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 1,81 (s, 1H), 1,91 (s, 2H), 4,01 (q, *J* = 7,7 Hz, 1H), 4,09 – 4,27 (m, 5H), 4,95 – 5,10 (m, 1H), 7,26 (td, *J* = 7,4, 1,2 Hz, 3H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,45 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 7,82 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 7,96 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,78 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H).

2. COMPOSTOS FMOC-PEPTÍDEO-COOH (COMPOSTOS 10A A 10J)

[00346] Os compostos do tipo FMoc-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2H foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e conforme exemplificado por FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H.

[00347] **FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10a):** Ácido 6-mercapto-hexanoico (287 µl, 2,07 mmol) foi dissolvido numa solução de TFA:diclorometano 1:4 (5 ml), então, adicionado a um frasco que contém FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-OAc (178 mg, 0,339 mmol). Permitiu-se que a reação avançasse com agitação magnética sob uma atmosfera de argônio à temperatura ambiente por 20 min. O material bruto foi concentrado *in vacuo,* dissolvido novamente em um volume mínimo de DMF e purificado em um cartucho C18 de 30 g, 30 mícrons em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% com um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 13 min a 35 ml/min. As frações que contêm o produto desejável puro foram congeladas e liofilizadas para gerar 200 mg (96% de rendimento) de um sólido branco. HRMS $(M + H)^+$ calcd. 613,2690; encontrado 613,2686. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 1,20 (dt, *J* = 7,1, 4,9 Hz, 10H), 1,31 (tt, *J* = 10,1, 6,0 Hz, 2H), 1,49 (dq, *J* = 12,5, 7,4 Hz, 4H), 2,18 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H),4,05 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 4,16 – 4,30 (m, 7H),

7,33 (td, *J* = 7,4, 1,2 Hz, 2H), 7,42 (td, *J* = 7,3, 1,1 Hz, 2H), 7,54 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,72 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,94 – 8,07 (m, 2H), 8,44 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H).

[00348] **FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10b):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 635,2510, encontrado 635,2515. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,15 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,18 – 1,25 (m, 10H), 2,18 (q, *J* = 7,5 Hz, 4H), 2,40 – 2,48 (m, 1H), 2,70 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,15 – 4,30 (m, 6H), 6,29 (s, 2H), 7,34 (q, *J* = 7,3 Hz, 3H), 7,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,63 – 7,78 (m, 1H), 7,85 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 8,37 – 8,46 (m, 1H).

[00349] **FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10c):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 635,2510, encontrado 635,2514. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,18 – 1,23 (m, 10H), 1,34 (q, *J* = 3,4 Hz, 5H), 2,24 (s, 2H), 2,44 (s, 2H), 4,05 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,16 – 4,35 (m, 8H), 7,33 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,58 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,71 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,90 (s, 1H), 7,98 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,39 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 11,98 (s, 1H).

[00350] **FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10d):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 635,2510, encontrado 635,2510. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,15 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,21 (d, *J* = 7,1 Hz, 9H), 1,28 – 1,38 (m, 3H), 1,44 – 1,60 (m, 5H), 2,13 – 2,22 (m, 3H), 3,33 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,20 (s, 2H), 6,29 (s, 2H), 7,29 – 7,40 (m, 3H), 7,38 – 7,47 (m, 3H), 7,85 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 8,26 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,48 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H).

[00351] **FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 542,2319, encontrado 542,2316. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,13 (dd, *J* = 7,1, 1,7 Hz, 6H), 1,16 – 1,25 (m, 2H), 1,32 – 1,47 (m, 4H), 2,08 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,25 (s, 2H), 3,99 (p, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,07 – 4,27 (m, 6H), 7,26 (t, *J* = 7,4, 1,2 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,52 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* =

7,5 Hz, 2H), 8,08 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,27 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 11,82 (s, 1H).

[00352] **FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10f):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 542,2319, encontrado 542,2321. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,13 (dd, *J* = 7,1, 1,8 Hz, 7H), 1,17 – 1,26 (m, 2H), 1,32 – 1,48 (m, 5H), 2,08 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,99 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,07 – 4,26 (m, 7H), 7,26 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,53 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 8,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,28 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00353] **FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO_2H (10h):** (16,7 mg, 0,031 mmol, 70% de rendimento). HRMS $(M+H)^+$ calcd. 542,2319, encontrado 542,2318.

[00354] **FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO_2H (10j):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 585,2377, encontrado 585,2367. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 1,14 – 1,26 (m, 9H), 1,75 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,27 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,54 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 3,97 – 4,10 (m, 1H), 4,13 – 4,34 (m, 7H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,42 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,57 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,71 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,97 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,14 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 8,41 (s, 1H), 12,06 (s, 1H).

[00355] **FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH)_2$-CO_2H (10i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 500,1850, encontrado 500,1843. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 1,20 (dd, *J* = 7,2, 1,9 Hz, 6H), 2,53 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,70 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,07 (q, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,17 – 4,26 (m, 4H), 4,29 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 7,33 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,41 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,72 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 8,14 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,42 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 12,22 (s, 1H).

3. COMPOSTOS FMOC-PEPTÍDEO-MAY-NMA (COMPOSTOS 11A A 11J)

[00356] Os compostos do tipo FMoc-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e confor-

me exemplificado por FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00357] **FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11a):** À solução de estoque DM-H (8,2 ml, 0,49 mmol) foi adicionado FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-COOH (300 mg, 0,49 mmol), EDC (94 mg, 0,490 mmol) e DIPEA (90 µl, 0,49 mmol). Permitiu-se que a reação avançasse com agitação magnética à temperatura ambiente sob atmosfera de argônio por 2 h. O material bruto foi concentrado por evaporação rotativa sob vácuo e o resíduo foi obtido em um volume mínimo de DMF, então, purificado em um cartucho C18 de 30 mícrons, 30 g em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 50% por 25 min. As frações que contêm produto desejável puro foram congeladas e liofilizadas para render 151 mg, (37,2% de rendimento) de sólido branco. HRMS $(M + Na)^+$ calcd. 1266,5170; encontrado 1266,5141. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,77 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,14 – 1,22 (m, 12H), 1,22 – 1,30 (m, 3H), 1,35 – 1,49 (m, 4H), 1,50 – 1,55 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 2,00 – 2,07 (m, 1H), 2,14 (ddd, *J* = 15,6, 8,7, 5,9 Hz, 1H), 2,40 (dtd, *J* = 17,0, 7,9, 7,0, 4,9 Hz, 3H), 2,69 (s, 3H), 2,79 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,20 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,43 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H), 3,48 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 4,08 (ddd, *J* = 20,8, 10,8, 5,0 Hz, 3H), 4,14 – 4,24 (m, 4H), 4,26 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H), 4,52 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,34 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,56 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 6,50 – 6,66 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 7,17 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,33 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 2H), 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,53 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,72 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,99 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,36 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00358] **FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11b):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1266,5170, encontrado 1266,5164. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,78 (s, 3H), 1,14 (dd, *J* = 14,6, 6,5 Hz, 6H),

1,22 (t, *J* = 6,8 Hz, 10H), 1,33 – 1,57 (m, 4H), 1,59 (s, 3H), 2,04 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 2,27 – 2,44 (m, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,80 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,14 – 3,28 (m, 5H), 3,37 – 3,55 (m, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,98 – 4,16 (m, 3H), 4,20 (dd, *J* = 15,6, 7,6 Hz, 7H), 4,52 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,57 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,46 – 6,72 (m, 4H), 6,88 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,60 – 7,75 (m, 4H), 7,80 – 7,93 (m, 4H), 8,12 (t, 1H), 8,29 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H).

[00359] **FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11c):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1266,5170, encontrado 1266,5170. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,96 – 1,16 (m, 10H), 1,16 – 1,51 (m, 10H), 1,52 (s, 4H), 1,82 – 2,16 (m, 1H), 2,17 – 2,56 (m, 11H), 2,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 4H), 2,68 – 2,87 (m, 3H), 2,92 – 3,04 (m, 4H), 3,09 – 3,22 (m, 7H), 3,24 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,33 – 3,50 (m, 2H), 3,73 – 3,89 (m, 4H), 3,92 – 4,07 (m, 2H), 4,07 – 4,25 (m, 2H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,40 – 5,55 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,33 – 6,66 (m, 4H), 6,81 (s, 2H), 7,03 – 7,19 (m, 1H), 7,19 – 7,43 (m, 2H), 7,62 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 7,73 – 7,85 (m, 1H).

[00360] **FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11d):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1266,5170, encontrado 1266,5158. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,78 (s, 3H), 1,06 – 1,33 (m, 16H), 1,44 (d, *J* = 10,3 Hz, 11H), 1,59 (s, 3H), 1,99 – 2,22 (m, 3H), 2,35 – 2,45 (m, 2H), 2,55 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,80 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 3,08 (s, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,39 – 3,52 (m, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,99 – 4,40 (m, 4H), 4,52 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,57 (dd, *J* = 14,5, 9,2 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,53 – 6,64 (m, 2H), 6,88 (s, 2H), 7,17 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 7,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,57 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,72 (s, 3H), 7,89 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H), 7,99 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,35 (s, 1H).

[00361] **FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11g):** HRMS

$(M+H)^+$ calcd. 1173,4980, encontrado 1173,4964. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,79 (s, 3H), 1,06 – 1,34 (m, 13H), 1,36 – 1,54 (m, 4H), 1,60 (s, 2H), 1,88 – 2,10 (m, 1H), 2,10 – 2,23 (m, 1H), 2,31 – 2,51 (m, 13H), 2,71 (s, 3H), 2,80 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,10 (s, 3H), 3,26 (s, 4H), 3,33 – 3,66 (m, 3H), 3,98 – 4,32 (m, 4H), 4,53 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,35 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,49 – 5,65 (m, 1H), 6,51 – 6,67 (m, 3H), 6,89 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,25 (s, 2H), 8,34 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,58 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00362] **FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11f):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1173,4980, encontrado 1173,4969.

[00363] **FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (11h):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1195,4907, encontrado 1195,4799. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0,71 (s, 3H), 1,00 – 1,22 (m, 13H), 1,28 – 1,45 (m, 2H), 1,52 (s, 3H), 1,91 – 2,14 (m, 1H), 2,26 (t, *J* = 1,9 Hz, 5H), 2,48 (t, *J* = 1,8 Hz, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,66 – 2,77 (m, 2H), 3,01 (s, 2H), 3,10 – 3,21 (m, 5H), 3,28 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (d, *J* = 6,7 Hz, 4H), 3,93 – 4,25 (m, 10H), 4,37 – 4,54 (m, 1H), 5,27 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,40 – 5,56 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,31 – 6,66 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,26 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H).

[00364] **FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (11j):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1216,5038, encontrado 1216,4999. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,78 (s, 3H), 0,95 – 1,29 (m, 16H), 1,37 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 1,46 (t, *J* = 12,5 Hz, 2H), 1,59 (s, 3H), 1,62 – 1,90 (m, 1H), 1,99 – 2,07 (m, 1H), 2,08 (s, 2H), 2,18 – 2,43 (m, 1H), 2,50 – 2,59 (m, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,73 – 2,83 (m, 1H), 3,10 (s, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,38 – 3,55 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,99 – 4,13 (m, 4H), 4,12 – 4,35 (m, 7H), 4,52 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,34 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,48 – 5,65 (m, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,48 – 6,70 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 7,17 (d, *J* = 1,7

Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,58 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,71 (t, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,95 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,29 – 8,38 (m, 1H), 8,41 (s, 1H).

[00365] **FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CO-DM (11i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1131,4510, encontrado 1131,4507. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,76 (s, 3H), 1,08 - 1,21 (m, 12H), 1,24 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 1,38 – 1,52 (m, 2H), 1,58 (s, 3H), 1,99 – 2,09 (m, 1H), 2,33 – 2,44 (m, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,80 (dd, *J* = 14,4, 8,6 Hz, 2H), 3,08 (s, 3H), 3,17 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,23 (s, 3H), 3,46 (t, *J* = 10,3 Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 4,00 – 4,13 (m, 3H), 4,13 – 4,34 (m, 5H), 4,52 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,30 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,55 (dd, *J* = 13,4, 9,1 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 6,55 (dd, *J* = 7,4, 5,7 Hz, 3H), 6,87 (s, 1H), 7,16 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,32 (tt, *J* = 7,4, 1,5 Hz, 2H), 7,41 (tt, *J* = 7,5, 1,5 Hz, 2H), 7,57 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,71 (dd, *J* = 10,5, 7,5 Hz, 2H), 7,88 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 8,14 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,37 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

4. AMINO-PEPTÍDEO-MAITANSINOIDES (COMPOSTOS 12A A 12J)

[00366] Os compostos do tipo H_2N-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e conforme exemplificado por H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00367] **H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12a):** FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (151 mg, 0,121 mmol) foi tratado com morfolina 20% em DMF (2 ml). Permitiu-se que a reação avançasse com agitação magnética sob argônio à temperatura ambiente por 1 h. O material bruto foi purificado em um cartucho de coluna C18, de 30 mícrons, 150 g em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 50% por 26 min. As frações que contêm produto desejável foram imediatamente congeladas e liofilizadas para gerar 46 mg (37,1% de rendimento) de um óleo incolor. HRMS $(M + H)^+$ calcd. 1022,4670; en-

contrado 1022,4669. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,78 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H), 1,13 – 1,21 (m, 10H), 1,21 – 1,31 (m, 3H), 1,37 – 1,50 (m, 4H), 1,51 – 1,57 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 2,04 (dd, *J* = 14,4, 2,8 Hz, 1H), 2,15 (ddd, *J* = 15,9, 8,7, 6,0 Hz, 1H), 2,38 (td, *J* = 7,0, 3,6 Hz, 2H), 2,70 (s, 3H), 2,79 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,21 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,33-3,55 (m, 8H), 3,93 (s, 3H), 4,01 – 4,33 (m, 5H), 4,52 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,34 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,57 (dd, *J* = 14,6, 9,0 Hz, 1H), 5,95 (s, 1H), 6,48 – 6,65 (m, 3H), 6,89 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,40 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00368] **H_2N-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12b):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1022,4670, encontrado 1022,4675. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,05 (dd, *J* = 6,7, 3,1 Hz, 7H), 1,08 – 1,16 (m, 10H), 1,19 (t, *J* = 8,1 Hz, 3H), 1,30 – 1,50 (m, 6H), 1,52 (s, 3H), 1,97 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H), 2,01 – 2,21 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,8 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,33 – 3,48 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,23 (m, 7H), 4,45 (dd, *J* = 13,1 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,41 – 5,58 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,39 – 6,63 (m, 4H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,36 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H).

[00369] **H_2N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12c):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1022,4670, encontrado 1022,4680. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,01 – 1,26 (m, 19H), 1,25 – 1,50 (m, 6H), 1,52 (s, 3H), 1,97 (d, *J* = 13,7 Hz, 1H), 2,02 – 2,22 (m, 1H), 2,35 (dd, *J* = 17,2, 9,5 Hz, 2H), 2,47 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 2,63 (s, 4H), 2,73 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,10 – 3,24 (m, 6H), 3,32 – 3,50 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,18 (m, 4H), 4,45 (dd, *J* = 12,1, 2,6 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,44 – 5,55 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,42 – 6,59 (m, 4H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,36 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00370] **H_2N-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12d):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1022,4670, encontrado 1022,4675. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,98 – 1,14 (m, 13H), 1,14 – 1,26 (m, 2H), 1,30 – 1,49 (m, 4H), 1,52 (s, 3H), 2,24 – 2,41 (m, 2H), 2,44 (d, *J* = 1,8 Hz, 16H), 2,63 (s, 2H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 2H), 3,08 – 3,21 (m, 4H), 3,32 – 3,49 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,92 – 4,23 (m, 3H), 4,45 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,26 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,40 – 5,57 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,41 – 6,66 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,35 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00371] **H_2N-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 951,4299, encontrado 951,4289. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,79 (s, 3H), 1,06 – 1,34 (m, 13H), 1,36 – 1,54 (m, 4H), 1,60 (s, 2H), 1,88 – 2,10 (m, 1H), 2,10 – 2,23 (m, 1H), 2,31 – 2,51 (m, 13H), 2,71 (s, 3H), 2,80 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,10 (s, 3H), 3,26 (s, 4H), 3,33 – 3,66 (m, 3H), 3,98 – 4,32 (m, 4H), 4,53 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,35 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,49 – 5,65 (m, 1H), 6,51 – 6,67 (m, 3H), 6,89 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,25 (s, 2H), 8,34 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,58 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00372] **H_2N-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12f):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 951,4226, encontrado 951,1299. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,00 – 1,13 (m, 11H), 1,19 (t, *J* = 8,9 Hz, 3H), 1,29 – 1,45 (m, 4H), 1,52 (s, 3H), 1,92 – 2,03 (m, 1H), 2,07 (dd, *J* = 15,7, 8,7 Hz, 1H), 2,23 – 2,39 (m, 1H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,07 – 3,32 (m, 14H), 3,34 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,21 (m, 4H), 4,45 (dd, *J* = 11,9, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,50 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,40 – 6,61 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,41 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H).

[00373] **H_2N-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (12h):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 950,4226, encontrado 951,4299. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,96 – 1,14 (m, 14H), 1,19 (t, *J* = 8,9 Hz,

3H), 1,38 (q, *J* = 10,5, 7,0 Hz, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,88 – 2,02 (m, 1H), 2,02 – 2,18 (m, 1H), 2,22 – 2,41 (m, 2H), 2,48 (s, 1H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,08 – 3,22 (m, 4H), 3,34 – 3,48 (m, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,95 – 4,23 (m, 5H), 4,45 (dd, *J* = 11,9, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,41 – 5,60 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,40 – 6,65 (m, 4H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,44 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H).

[00374] **H_2N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (12j):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 994,4357, encontrado 994,4330.

[00375] **H_2N-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CO-DM (12i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 909,3830, encontrado 909,3826. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,77 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H), 1,17 (dd, *J* = 7,0, 5,2 Hz, 6H), 1,25 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H), 1,40 – 1,51 (m, 2H), 1,59 (s, 3H), 2,04 (dd, *J* = 14,4, 2,9 Hz, 1H), 2,41 (ddt, *J* = 18,6, 10,1, 5,4 Hz, 1H), 2,61 – 2,70 (m, 1H), 2,72 (s, 3H), 2,76 – 2,90 (m, 3H), 3,09 (s, 3H), 3,20 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,33 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,39 – 3,64 (m, 3H), 3,93 (s, 3H), 4,03 – 4,16 (m, 2H), 4,24 (dt, *J* = 15,1, 7,6 Hz, 2H), 4,53 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,32 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,51 – 5,64 (m, 1H), 5,93 (s, 1H), 6,49 – 6,62 (m, 2H), 6,88 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,55 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

5. SPDB-PEPTÍDEO-MAITANSINOIDES (COMPOSTOS 13A A 13J)

[00376] Compostos do tipo SPDB-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e conforme exemplificado por SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00377] **SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13a):** H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (46 mg, 0,045 mmol) foi dissolvido em DMF (2 ml), ao qual foi adicionado SPDB (14,7 mg, 0,045 mmol) e reagido à temperatura ambiente com agitação magnética sob uma atmosfera de argônio por 1 h. O material bruto foi purificado em um cartucho C18, de 430 mícrons, 30 g em eluição com água

deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 35 min. As frações que contêm o produto desejável puro foram congeladas e liofilizadas para gerar 38 mg, (68,5% de rendimento) de sólido branco. HRMS $(M + H)^+$ calcd. 1233,4796; encontrado 1233,4783. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,78 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,14 – 1,21 (m, 10H), 1,22 – 1,30 (m, 3H), 1,44 (qd, *J* = 10,2, 4,5 Hz, 5H), 1,50 – 1,56 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,84 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,04 (dd, *J* = 14,4, 2,7 Hz, 1H), 2,15 (ddd, *J* = 15,8, 8,6, 5,9 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,39 (dtdd, *J* = 18,1, 13,2, 8,1, 4,7 Hz, 3H), 2,70 (s, 3H), 2,76 – 2,86 (m, 3H), 3,09 (s, 3H), 3,21 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,43 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,48 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 4,13 (s, 2H), 4,19 (h, *J* = 6,6 Hz, 4H), 4,52 (dd, *J* = 12,1, 2,8 Hz, 1H), 5,34 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,56 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,49 – 6,66 (m, 3H), 6,85 – 6,97 (m, 2H), 7,18 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,23 (ddd, *J* = 7,3, 4,8, 1,2 Hz, 1H), 7,76 (dt, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,78 – 7,91 (m, 2H), 8,00 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 8,33 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,44 (dt, *J* = 4,7, 1,3 Hz, 1H), 8,50 (s, 1H).

[00378] **SPDB-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13b):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1233,4796, encontrado 1233,4799. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,01 – 1,22 (m, 13H), 1,27 – 1,45 (m, 2H), 1,52 (s, 3H), 1,91 – 2,16 (m, 1H), 2,26 (d, *J* = 7,4 Hz, 7H), 2,26 (t, *J* = 1,9 Hz, 4H), 2,48 (t, *J* = 1,8 Hz, 2H), 2,57 – 2,65 (m, 3H), 2,65 – 2,77 (m, 2H), 3,01 (s, 2H), 3,13 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,32 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (d, *J* = 6,7 Hz, 4H), 3,93 – 4,11 (m, 3H), 4,18 (t, *J* = 11,2 Hz, 7H), 4,39 – 4,50 (m, 1H), 5,27 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,50 (dd, *J* = 14,7, 8,8 Hz, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,37 – 6,61 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,26 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H).

[00379] **SPDB- L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13c):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1233,4796, encontrado 1233,4795. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,25 (m, 18H), 1,29 – 1,50 (m, 6H), 1,52 (s, 3H), 1,70 – 1,87 (m, 2H), 1,87 – 2,14 (m, 2H), 2,13 – 2,22 (m, 2H), 2,27 – 2,40 (m, 3H), 2,63 (s, 3H), 2,69 – 2,84 (m, 4H), 3,02 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,32 – 3,45 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,95 – 4,07 (m, 2H), 4,07 – 4,19 (m, 4H), 4,45 (dd, *J* = 11,9, 2,7 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,55 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,42 – 6,59 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,13 – 7,19 (m, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,2, 2,7 Hz, 1H), 7,72 – 7,80 (m, 1H), 7,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 8,04 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,25 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,37 (dd, *J* = 5,0, 1,9 Hz, 1H).

[00380] **SPDB- L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13d):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1233,4796, encontrado 1233,4797. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,72 (d, *J* = 3,3 Hz, 3H), 0,98 – 1,28 (m, 22H), 1,30 – 1,46 (m, 3H), 1,53 (s, 3H), 1,78 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,86 – 2,16 (m, 2H), 2,19 (q, *J* = 7,4, 5,6 Hz, 2H), 2,26 – 2,41 (m, 2H), 2,41 – 2,55 (m, 4H), 2,64 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H), 2,81 – 2,92 (m, 1H), 3,02 (s, 2H), 3,14 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,26 (s, 1H), 3,31 – 3,48 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,97 – 4,30 (m, 7H), 4,46 (dd, *J* = 11,8, 3,2 Hz, 1H), 5,24 – 5,36 (m, 1H), 5,45 – 5,62 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,40 – 6,65 (m, 3H), 6,82 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,18 (d, *J* = 12,1, 6,1, 4,9 Hz, 2H), 7,69 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,75 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,8, 3,2 Hz, 1H), 7,95 – 8,04 (m, 2H), 8,26 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H), 8,33 – 8,47 (m, 1H).

[00381] **SPDB-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1162,4425, encontrado 1162,4405. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,08 (dt, *J* = 13,9, 6,9 Hz, 15H), 1,15 – 1,25 (m, 3H), 1,28 – 1,44 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,77 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,91 – 2,02 (m, 1H), 2,02 – 2,13 (m, 1H), 2,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H),

2,22 – 2,40 (m, 2H), 2,63 (s, 3H), 2,68 – 2,80 (m, 3H), 3,02 (s, 3H), 3,13 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,33 – 3,45 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,95 – 4,16 (m, 5H), 4,45 (dd, *J* = 12,1, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,56 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,43 – 6,60 (m, 3H), 6,82 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,12 – 7,18 (m, 1H), 7,65 – 7,79 (m, 2H), 8,06 – 8,16 (m, 2H), 8,30 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,35 – 8,40 (m, 1H).

[00382] **SPDB-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13f):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1162,4399, encontrado 1162,455. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,13 (m, 12H), 1,14 – 1,25 (m, 3H), 1,31 – 1,44 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,77 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,97 (d, *J* = 14,3, 2,7 Hz, 1H), 2,02 – 2,13 (m, 1H), 2,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,28 – 2,40 (m, 3H), 2,43 (m, *J* = 3,2 Hz, 3H), 2,63 (s, 3H), 2,69 – 2,80 (m, 3H), 3,02 (s, 3H), 3,13 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,39 (dd, *J* = 21,0, 10,7 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,96 – 4,18 (m, 5H), 4,45 (dd, *J* = 12,1, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,45 – 5,55 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,43 – 6,60 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,10 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,16 (t, *J* = 7,2, 4,9 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,71 – 7,79 (m, 1H), 8,02 – 8,15 (m, 2H), 8,28 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,37 (d, *J* = 4,8, 1,7 Hz, 1H).

[00383] **SPDB-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (13h):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1162,4399, encontrado 1162,455. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,16 (m, 13H), 1,14 – 1,25 (m, 3H), 1,28 – 1,49 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,77 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,92 – 2,14 (m, 2H), 2,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,23 – 2,40 (m, 2H), 2,46 – 2,54 (m, 1H), 2,63 (s, 3H), 2,65 – 2,85 (m, 4H), 3,02 (s, 3H), 3,03 – 3,16 (m, 2H), 3,18 (s, 3H), 3,28 – 3,45 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,95 – 4,20 (m, 5H), 4,45 (dd, *J* = 12,1, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,55 (m, 1H), 5,82 – 5,88 (m, 1H), 6,42 – 6,59 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,14 – 7,20 (m, 1H), 7,67 – 7,72 (m, 1H), 7,72 – 7,80 (m, 1H), 7,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,28

(t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,35 – 8,40 (m, 1H).

[00384] **SPDB-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (13j):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1203,4337, encontrado 1203,4315. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,94 – 1,24 (m, 20H), 1,38 (s, 3H), 1,52 (s, 3H), 1,57 – 1,87 (m, 1H), 1,89 – 2,08 (m, 1H), 2,26 (t, *J* = 15,1 Hz, 1H), 2,50 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,54 – 2,79 (m, 7H), 3,05 (d, *J* = 3,8 Hz, 3H), 3,18 (s, 5H), 3,29 – 3,46 (m, 3H), 3,86 (d, *J* = 6,1 Hz, 4H), 4,00 (s, 3H), 4,05 – 4,24 (m, 4H), 4,33 – 4,54 (m, 1H), 5,17 – 5,38 (m, 1H), 5,39 – 5,58 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,29 – 6,58 (m, 4H), 6,63 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 7,04 – 7,19 (m, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,14 – 8,39 (m, 1H), 8,45 (s, 1H).

[00385] **SPDB-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CO-DM (13i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1120,3955, encontrado 1120,3951. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,74 – 0,82 (m, 3H), 1,10 – 1,22 (m, 13H), 1,25 (d, *J* = 14,1 Hz, 1H), 1,46 (t, *J* = 10,9 Hz, 2H), 1,56 – 1,63 (m, 3H), 1,85 (ddd, *J* = 14,4, 9,0, 5,1 Hz, 2H), 2,00 (ddd, *J* = 14,7, 9,3, 5,4 Hz, 9H), 2,24 (dt, *J* = 10,8, 5,0 Hz, 2H), 2,72 (d, *J* = 3,6 Hz, 2H), 2,94 (dq, *J* = 10,7, 7,2, 5,7 Hz, 9H), 3,10 (d, *J* = 3,7 Hz, 3H), 3,20 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 3,25 (d, *J* = 3,6 Hz, 3H), 3,32 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 3,47 (td, *J* = 10,7, 10,0, 3,8 Hz, 2H), 3,93 (t, *J* = 4,6 Hz, 3H), 4,02 – 4,25 (m, 6H), 4,49 – 4,57 (m, 1H), 5,28 – 5,37 (m, 1H), 5,53 – 5,62 (m, 1H), 5,92 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,57 (q, *J* = 5,4, 4,5 Hz, 3H), 6,85 – 6,93 (m, 1H), 7,17 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 7,25 (dq, *J* = 8,0, 4,9 Hz, 6H), 7,72 – 7,87 (m, 11H), 8,16 (dt, *J* = 15,4, 4,9 Hz, 2H), 8,45 (tt, *J* = 9,9, 5,9 Hz, 6H).

6. TIO-PEPTÍDEO-MAITANSINOIDES (COMPOSTOS 14A A 14J)

[00386] Compostos do tipo HS-$(CH_2)_3$CO-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9A e conforme exemplificado por HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00387] **HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM**

(14a): SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (38 mg, 0,031 mmol) foi dissolvido em DMSO (1 ml) ao qual uma solução de DTT (19 mg, 0,12 mmol) em fosfato de potássio 100 mM, tampão EDTA 2 mM a pH 7,5 (1 ml) foi adicionado. Permitiu-se que a reação avançasse à temperatura ambiente com agitação magnética sob argônio por 1 h. A reação bruta foi purificada em um cartucho C18 de 30 mícrons, 30 g em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 35 min. As frações que contêm produto desejável foram imediatamente congeladas e liofilizadas para gerar 18,2 mg, (52,5% de rendimento) de um sólido branco. HRMS (M + H)+ calcd. 1124,4809; encontrado 1124,4798. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,78 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,14 – 1,21 (m, 10H), 1,22 – 1,30 (m, 3H), 1,37 – 1,50 (m, 5H), 1,51 – 1,57 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,74 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,04 (dd, *J* = 14,4, 2,8 Hz, 1H), 2,09 – 2,18 (m, 1H), 2,18 – 2,24 (m, 2H), 2,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,38 (td, *J* = 7,1, 4,7 Hz, 2H), 2,44 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,70 (s, 3H), 2,79 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,21 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,43 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,49 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 4,08 (ddd, *J* = 21,6, 11,4, 4,1 Hz, 2H), 4,13 – 4,28 (m, 4H), 4,52 (dd, *J* = 12,1, 2,8 Hz, 1H), 5,34 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,56 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H), 5,91 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 6,48 – 6,66 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,86 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,96 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 8,33 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00388] **HS-$(CH_2)_3$CO-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14b):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1146,4629, encontrado 1146,4591. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,03 – 1,25 (m, 19H), 1,30 – 1,45 (m, 6H), 1,52 (s, 4H), 1,65 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,91 – 2,02 (m, 1H), 2,02 – 2,13 (m, 1H), 2,12 – 2,19 (m, 4H), 2,29 – 2,39 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,5 Hz,

1H), 3,33 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 4,01 (td, *J* = 10,4, 9,7, 4,3 Hz, 2H), 4,04 – 4,16 (m, 5H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,43 – 5,56 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,38 – 6,61 (m, 4H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,97 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,25 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H).

[00389] **HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14c):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1146,4629, encontrado 1146,4553. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,99 – 1,26 (m, 21H), 1,31 – 1,45 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,67 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,89 – 2,02 (m, 1H), 2,02 – 2,24 (m, 4H), 2,25 – 2,46 (m, 3H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 3,32 – 3,51 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,96 – 4,18 (m, 7H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,27 (q, J = 6,8 Hz, 1H), 5,44 – 5,63 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,37 – 6,59 (m, 4H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,27 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00390] **HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14d):** HRMS $(M+Na)^+$ calcd. 1146,4629, encontrado 1146,4519. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,95 – 1,24 (m, 20H), 1,27 – 1,45 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,67 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,93 – 2,01 (m, 1H), 2,02 – 2,22 (m, 4H), 2,22 – 2,41 (m, 5H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,18 (s, 4H), 3,39 (dd, *J* = 21,4, 10,7 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,94 – 4,24 (m, 6H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,57 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,37 – 6,65 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,93 – 8,05 (m, 2H), 8,26 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H).

[00391] **HS-$(CH_2)_3$CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1053,4438, encontrado 1053,4426. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,01 – 1,15 (m, 13H), 1,15 – 1,27 (m, 3H), 1,31 – 1,44 (m, 5H), 1,53 (s, 3H), 1,67 (p, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,93 – 2,03 (m, 1H), 2,03 – 2,23 (m, 4H), 2,22 – 2,41 (m, 5H), 2,63 (s,

3H), 2,73 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,32 – 3,46 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,92 – 4,20 (m, 6H), 4,45 (dd, *J* = 11,9, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,42 – 5,58 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,42 – 6,60 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,30 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00392] **HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14f):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1053,4366, encontrado 1053,4438. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,14 (m, 13H), 1,19 (t, *J* = 9,7 Hz, 3H), 1,31 – 1,43 (m, 6H), 1,53 (s, 3H), 1,67 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,91 – 2,02 (m, 1H), 2,02 – 2,22 (m, 4H), 2,34 – 2,39 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,19 (d, *J* = 4,2 Hz, 4H), 3,30 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,94 – 4,20 (m, 6H), 4,45 (d, *J* = 11,8, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,56 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,40 – 6,61 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,29 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H).

[00393] **HS-$(CH_2)_3$CO-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (14h):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1053,4366, encontrado 1053,4438. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSFO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,15 (m, 13H), 1,14 – 1,24 (m, 3H), 1,30 – 1,45 (m, 5H), 1,53 (s, 3H), 1,67 (p, J = 7,1 Hz, 2H), 1,90 – 2,01 (m, 1H), 2,01 – 2,24 (m, 4H), 2,27 – 2,33 (m, 1H), 2,33 – 2,42 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,10 – 3,21 (m, 4H), 3,33 – 3,46 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,18 (m, 6H), 4,45 (dd, *J* = 11,9, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,55 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,42 – 6,59 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,30 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00394] **HS-$(CH_2)_3$CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (14j):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1096,4496, encontrado 1096,4464. RMN de 1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,78 (s, 3H), 1,02 – 1,31 (m, 19H), 1,35

– 1,55 (m, 2H), 1,60 (s, 3H), 1,74 (p, *J* = 7,4 Hz, 3H), 1,78 – 1,93 (m, 1H), 2,14 – 2,33 (m, 4H), 2,41 – 2,49 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 2,80 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,22 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,26 (s, 3H), 3,47 (dd, *J* = 21,3, 10,6 Hz, 2H), 3,93 (s, 4H), 4,03 – 4,13 (m, 3H), 4,13 – 4,25 (m, 3H), 4,52 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,35 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,50 – 5,64 (m, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,47 – 6,69 (m, 4H), 6,88 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,32 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00395] **HS-$(CH_2)_3$CO-$(CH_2)_3$-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CO-DM (14i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1011,3969, encontrado 1011,3961. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,77 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,17 (dd, *J* = 7,0, 5,1 Hz, 9H), 1,25 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 1,40 – 1,51 (m, 2H), 1,59 (s, 3H), 1,74 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,00 – 2,08 (m, 1H), 2,23 (dt, *J* = 16,8, 7,6 Hz, 3H), 2,43 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,62 – 2,69 (m, 1H), 2,72 (s, 3H), 2,76 – 2,88 (m, 2H), 3,10 (s, 3H), 3,20 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 3,25 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,39 – 3,54 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,01 – 4,26 (m, 5H), 4,53 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,32 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,49 – 5,63 (m, 1H), 5,92 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 6,48 – 6,62 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,41 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

7. HOOC-$(CH_2)_3$-CO-PEPTÍDEO-NH-CH_2-S-$(CH_2)_N$-CO_2-DM (COMPOSTOS 19A A 19J)

[00396] Os compostos do tipo HOOC-$(CH_2)_3$-CO-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9B e conforme exemplificado por HOOC-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00397] **HOOC-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (19a)**: L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (17,25 mg, 0,017 mmol) foi tratado com anidrido glutárico (38,5 mg, 0,337 mmol) e reagiu à temperatura ambiente com agitação magnética sob argônio

de um dia para o outro. A reação bruta foi purificada por HPLC com o uso de uma coluna XDB-C18, de 21,2 x 5 mm, 5 mícrons em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 30 min a 20 ml/min. As frações que contêm produto desejável puro foram imediatamente combinadas, congeladas e liofilizadas para gerar 3 mg, (15% de rendimento) de sólido branco. HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1136,4987, encontrado 1136,4954. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,92 – 1,27 (m, 20H), 1,26 – 1,48 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,63 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,83 – 2,20 (m, 7H), 2,23 – 2,41 (m, 5H), 2,63 (s, 4H), 2,73 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,36 – 3,50 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,91 – 4,24 (m, 7H), 4,45 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,41 – 5,57 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,32 – 6,66 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 8,06 (t, *J* = 9,1 Hz, 2H), 8,35 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 8,62 (s, 1H).

[00398] **HOOC-$(CH_2)_3$-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (19g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1136,4987, encontrado 1136,4962. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 0,97 – 1,14 (m, 13H), 1,14 – 1,26 (m, 3H), 1,28 – 1,45 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,62 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,93 – 2,00 (m, 1H), 2,08 (dt, *J* = 13,1, 7,4 Hz, 6H), 2,25 – 2,41 (m, 3H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 3,31 – 3,48 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,93 – 4,19 (m, 6H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,43 – 5,58 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,40 – 6,61 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,34 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 11,94 (s, 1H).

[00399] **HOOC-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (19i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1108,4674, encontrado 1108,4634. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,78 (s, 3H), 1,04 – 1,32 (m, 16H), 1,45 (d, *J* = 12,6 Hz, 2H), 1,60 (s, 3H), 1,69 (p, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,77 – 1,95 (m, 1H), 1,99 – 2,07 (m, 1H), 2,11 – 2,20 (m, 4H), 2,20 – 2,39 (m,

1H), 2,55 (s, 1H), 2,71 (s, 3H), 2,80 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,40 (d, *J* = 21,0 Hz, 8H), 3,49 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 4,02 – 4,27 (m, 6H), 4,48 – 4,61 (m, 1H), 5,34 (q, J = 6,6 Hz, 1H), 5,48 – 5,65 (m, 1H), 5,92 (s, 1H), 6,50 – 6,71 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,99 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,22 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,42 (s, 1H).

8. NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-PEPTÍDEO-NH-CH_2-S-$(CH_2)_N$-CO_2-DM (COMPOSTO 20A A 20J)

[00400] Compostos do tipo NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-Peptídeo-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DM foram preparados conforme mostrado na Figura 9B e conforme exemplificado por NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM.

[00401] **NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (20g):** HOOC-$(CH_2)_3$-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (8 mg 7,5 μmol) foi dissolvido em DMSO (1 ml), tratado com NHS (0,9 mg, 7,51 μmol) e EDC (1,4 mg, 7,51 μmol). Permitiu-se que a reação avançasse à temperatura ambiente com agitação magnética sob uma atmosfera de argônio por 2 horas. O material bruto foi purificado por meio de HPLC com o uso de uma coluna XDB-C18, de 21,2 x 5 mm, 5 μm em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 30 min a 20 ml/min. As frações que contêm produto desejável foram combinadas e imediatamente congeladas, então, liofilizadas para gerar 6,5 mg (74% de rendimento) de sólido branco. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,00 – 1,14 (m, 13H), 1,14 – 1,25 (m, 3H), 1,29 – 1,46 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,75 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,92 – 2,12 (m, 2H), 2,16 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,22 – 2,39 (m, 3H), 2,62 (d, *J* = 10,8 Hz, 5H), 2,73 (d, *J* = 10,5 Hz, 5H), 3,02 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 3,32 – 3,47 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,19 (m, 6H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,8 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,42 – 5,57 (m, 1H), 5,82 – 5,87 (m, 1H), 6,41 – 6,60 (m,

4H), 6,81 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,20 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,29 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H).

[00402] **NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (20g):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1233,5151, encontrado 1233,5135.

[00403] **NHS-OOC-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_3$-CO-DM (20i):** HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1205,4838, encontrado 1205,4808.

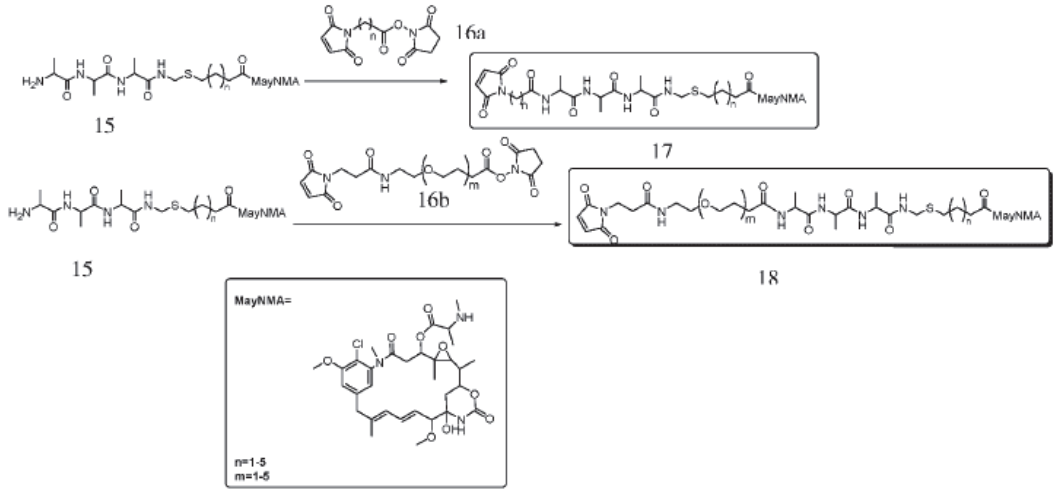
9. MAL-$(CH_2)_3$-CO-PEPTÍDEO-NH-CH_2-S-$(CH_2)_N$-CO-DM (COMPOSTOS 23A A 23J)

[00404] Os compostos 23a a 23j podem ser preparados conforme mostrado na Figura 9B e conforme exemplificado para o composto 23c.

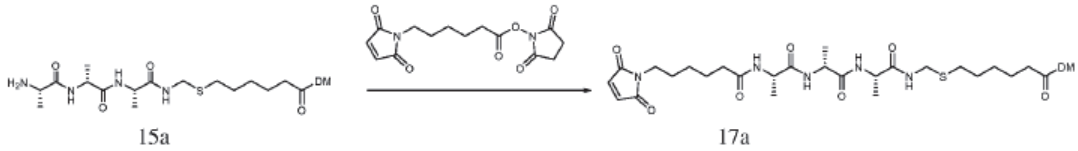
[00405] **Mal-$(CH_2)_3$-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM ou Mal-LDL-DM (23c):** H_2N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM (8 mg, 7,82 µmol), foi dissolvido em DMF (2 ml), tratado com ácido 3-maleimidopropanoico (1,32 mg, 7,82 µmol), EDC (2,25 mg, 0,012 mmol) e HOBt (1,198 mg, 7,82 µmol). Permitiu-se que a reação avançasse à temperatura ambiente com agitação magnética sob uma atmosfera de argônio por 2 h. O material bruto foi purificado por meio de HPLC semi-prep com o uso de uma coluna XDB-C18, 21,2x5 mm, 5 µm em eluição com água deionizada que contém ácido fórmico 0,1% e um gradiente linear de acetonitrila de 5% a 95% por 30 min a 20 ml/min. As frações que contêm produto desejável foram imediatamente combinadas e congeladas, então, liofilizadas para gerar 1,8 mg (19,60% de rendimento) de sólido branco. HRMS $(M+H)^+$ calcd. 1173,4940, encontrado 1173,4931. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ 0,71 (s, 3H), 1,02 – 1,14 (m, 15H), 1,16 – 1,25 (m, 3H), 1,30 – 1,44 (m, 5H), 1,52 (s, 3H), 1,92 – 2,03 (m, 1H), 2,03 – 2,17 (m, 1H), 2,23 –

2,39 (m, 4H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,18 (s, 4H), 3,33 – 3,46 (m, 2H), 3,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,95 – 4,17 (m, 7H), 4,45 (dd, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,44 – 5,56 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,39 – 6,64 (m, 3H), 6,81 (s, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,92 (s, 2H), 7,11 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,17 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,28 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,43 (s, 1H).

10. OUTROS COMPOSTOS



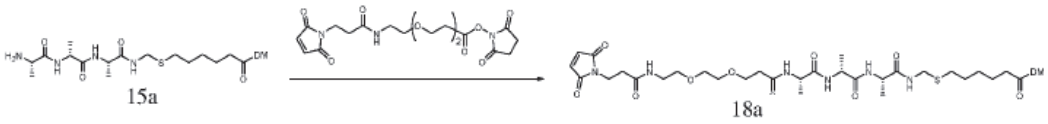
Mal2-LAla-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May



[00406] *Mal-C5-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May:* A reação entre L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA (composto I-1a) (25 mg, 0,024 mmol), e 6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (7,54 mg, 0,024 mmol) rendeu Mal-C5-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May (composto I-2a) *(*20,8 mg, 0,017 mmol, 70,0% de rendimento). LRMS $(M+H)^+$ calcd 1215,52, encontrado 1216,4. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,71 (s, 3H), 1,05 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,07 – 1,14 (m, 14H), 1,15 – 1,25 (m, 3H), 1,39 (t, *J* = 9,2 Hz, 10H), 1,52 (s, 3H), 2,01 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H), 2,26 (t, *J* = 1,9 Hz, 1H), 2,28 – 2,38 (m, 2H), 2,57 – 2,62 (m, 1H), 2,63 (s, 3H), 2,73 (d, *J* = 9,6

Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,36 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 3,42 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,96 – 4,05 (m, 1H), 4,04 – 4,15 (m, 4H), 4,41 – 4,48 (m, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,46 – 5,54 (m, 1H), 5,82 – 5,88 (m, 1H), 6,47 – 6,50 (m, 2H), 6,54 (t, *J* = 11,4 Hz, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,92 (s, 2H), 7,11 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,86 – 7,93 (m, 2H), 7,95 (s, 1H), 8,05 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,24 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H).

Mal-$(CH_2)_2$-PEG_2-CO-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH2-S-(CH2)5-CO-MayNMA

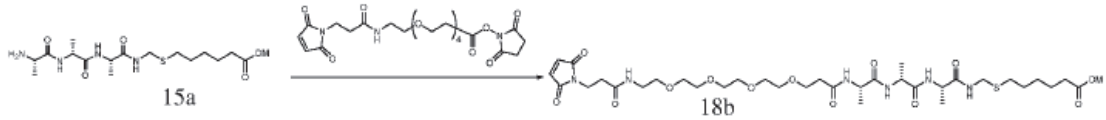


[00407] *Mal-$(CH_2)_2$-PEG_2-CO-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA:*

[00408] A reação entre L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA (composto I-1a) (25 mg, 0,024 mmol) e Mal-amido-PEG_2-NHS (10,40 mg, 0,024 mmol) rendeu Mal-$(CH2)_2$-PEG_2-CO2-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA (composto I-3a) (14,1 mg, 10,58 µmol, 43,3% de rendimento). LRMS $(M+H)^+$ calcd 1332,58, encontrado 1332,95.

[00409] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,71 (s, 4H), 1,05 (d, *J* = 6,3 Hz, 4H), 1,07 – 1,14 (m, 15H), 1,18 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 1,37 (d, *J* = 11,8 Hz, 6H), 1,52 (s, 3H), 2,23 – 2,38 (m, 5H), 2,63 (s, 4H), 2,72 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,07 (q, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,18 (s, 3H), 3,39 (s, 4H), 3,41 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 3,47 – 3,56 (m, 4H), 3,86 (s, 4H), 3,95 – 4,08 (m, 2H), 4,08 – 4,19 (m, 3H), 4,41 – 4,51 (m, 1H), 5,23 – 5,31 (m, 1H), 5,44 – 5,54 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,46 – 6,50 (m, 2H), 6,54 (t, *J* = 11,3 Hz, 2H), 6,83 (s, 1H), 6,93 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 7,88 – 8,00 (m, 2H), 8,01 – 8,08 (m, 2H), 8,27 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H).

Mal-$(CH_2)_2$-PEG_4-CO-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA



15a 18b

[00410] *Mal-$(CH_2)_2$-PEG_4-CO_2-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA:*

[00411] A reação entre L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA (composto I-1a) (25 mg, 0,024 mmol) e Mal-amido-PEG4-NHS (12,55 mg, 0,024 mmol) rendeu Mal-$(CH_2)_2$-PEG_4-CO2-L-Ala-D-Ala-L-ALa-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-MayNMA Mal-PEG4-CO2-C6-LDL-DM (composto I-3b) (22,3 mg, 0,016 mmol, 64,2% de rendimento).

LRMS $(M+H)^+$ calcd 1420,63, encontrado 1420,06

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 0,71 (s, 4H), 1,05 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,07 – 1,16 (m, 14H), 1,19 (t, *J* = 8,1 Hz, 2H), 1,31 – 1,50 (m, 2H), 1,52 (s, 4H), 1,98 (s, 1H), 2,02 – 2,17 (m, 2H), 2,20 – 2,40 (m, 7H), 2,63 (s, 4H), 2,73 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 3,05 – 3,12 (m, 2H), 3,18 (s, 3H), 3,28 – 3,36 (m, 1H), 3,37 – 3,45 (m, 15H), 3,47 – 3,57 (m, 4H), 3,86 (s, 4H), 3,94 – 4,08 (m, 2H), 4,12 (ddt, *J* = 14,5, 7,3, 3,6 Hz, 4H), 4,41 – 4,49 (m, 1H), 5,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,45 – 5,55 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,42 – 6,60 (m, 4H), 6,83 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,89 – 8,00 (m, 2H), 8,00 – 8,09 (m, 2H), 8,26 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H).

EXEMPLO 11

PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE LISINA-DM LIGADO DE ANTICORPOS ANTI-ADAM9

A. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)-SSPDB-DM4

[00412] hMAB-A(2I.2) é um anticorpo humanizado/otimizado com uma sequência de cadeia leve da SEQ ID NO:68 e uma sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO:52 (X na SEQ ID NO:52 é K).

[00413] Para preparar o conjugado hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4, adições de sulfo-SPDB (sSPDB) e DM4 foram realizadas em etapas. Primeiro, uma solução que contém anticorpo hMAB-A(2I.2) anticorpo

tamponada a pH 8,1 com ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanossulfônico 50 mM (EPPS), cloreto de sódio 50 mM foi misturado com DMA e 11,5 equivalentes de sSPDB de uma solução de estoque de DMA de modo que a composição de solvente final fosse DMA 10% (v/v) e tampão aquoso 90% (v/v). Após permitir que a primeira etapa de reação avançasse por 4 h a 25°C, 17,3 equivalentes de DM4 de uma solução de estoque de DMA, DMA, e tampão EPPS 500 mM/cloreto de sódio 500 mM a pH 8,1 foram adicionados à mistura de reação de modo que a composição de solvente final de DMA 10% (v/v) e tampão aquoso 90% (v/v) da primeira etapa de reação fosse mantida. Permitiu-se que a segunda etapa de reação avançasse de um dia para o outro a 25°C.

[00414] O conjugado foi purificado em succinato 10 mM, glicina 250 mM, sacarose 0,5%, Tween-20 0,01%, pH 5,5 por colunas de dessalinização Sephadex G-25, dialisado contra este tampão com o uso de uma membrana com um corte de peso molecular de 10 kDa, e filtrado através de um filtro de seringa de 0,22 µm.

[00415] O conjugado teve uma média de 3,5 mol de DM4/mol de anticorpo por UV-vis, 99,2% de monômero por SEC, e ≤ 1,7% de DM4 não conjugado por HPLC de modo misturado. A LC-MS do conjugado deglicosilado não é mostrada.

B. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)-S442C-MAL-LDL-DM

[00416] hMAB-A(2I.2)-S442C é um anticorpo humanizado/otimizado com uma sequência de cadeia leve da SEQ ID NO:68 e uma sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO:142 (em que X é K).

[00417] O anticorpo hMAB-A(2I.2)-S442C que porta dois resíduos de cisteína não pareados (na posição C442 da região CH3 de cadeia pesada) no estado reduzido foi preparado com o uso de procedimentos padrão e purificado em solução salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4, EDTA 2 mM. A solução de anticorpo reduzida e reoxidada foi

usada imediatamente para conjugação com Mal-LDL-DM (composto 17a).

[00418] O anticorpo hMAB-A(2I.2)-S442C reoxidado foi misturado com PBS pH 6,0, EDTA 2 mM e a conjugação foi executada em solução aquosa 90% com N-N-dimetilacetamida 10% (DMA, SAFC) e 5 equivalentes de Mal-LDL-DM (composto 17a). A reação foi incubada de um dia para o outro a 25°C.

[00419] Pós-reação, o conjugado foi purificado em Acetato 10 mM, sacarose 9%, Tween-20 0,01%, tampão de formulação de pH 5,0 com o uso de colunas de dessalinização NAP (GE Healthcare) e filtradas através de um filtro de seringa com uma membrana de PVDF de 0,22 µm.

[00420] O conjugado purificado foi constatado como tendo 2,1 mol de LDL-DM/mol de anticorpo por UV-Vis, monômero 95% por SEC, e fármaco livre abaixo de 1% por análise de coluna dupla de SEC/HPLC.

C. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)-SGMBS-LDL-DM, DAR 3,1

[00421] Antes da conjugação, sGMBS-LDL-DM foi preparado misturando-se uma solução de estoque de sGMBS (Figura 9C) em N-N-dimetilacetamida (DMA, SAFC) com uma solução de estoque de LDL-DM (composto 14c na Figura 9A) em DMA na presença de tampão succinato de pH 5,0 para obter uma solução orgânica:aquosa 60:40 e concentrações finais de sulfo-GMBS 3 mM e LDL-DM 3,9 mM. A reação foi incubada por 2 h a 25°C. A mistura sGMBS-LDL-DM bruta foi adicionada a uma solução que contém anticorpo hMAB-A(2I.2) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 misturada com solução 5x de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanossulfônico 300 mM (EPPS) de pH 8,5 e DMA 10% (v/v) a uma razão final entre 7,8 mol de sulfo-GMBS-LDL-DM e 1 mol de anticorpo hMAB-A (2I.2). A reação foi incubada de um dia para o outro a 25°C.

[00422] A reação foi purificada em Histidina 10 mM, Glicina 250

mM, Sacarose 1%, Tween-20 0,01%, tampão de formulação de pH 5,5 com o uso de colunas de dessalinização NAP (GE Healthcare) e filtradas através de um filtro de seringa com uma membrana de PVDF de 0,22 µm.

[00423] O conjugado purificado foi constatado como tendo 3,1 mol de LDL-DM/mol de anticorpo por UV-Vis, monômero 97% por SEC, e fármaco livre abaixo de 4% por análise de coluna dupla de SEC/HPLC.

D. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)-SGMBS-LDL-DM, DAR 2,0

[00424] Antes da conjugação, sGMBS-LDL-DM foi preparado misturando-se uma solução de estoque de sGMBS em N-N-dimetilacetamida (DMA, SAFC) com uma solução de estoque de LDL-DM (composto 14c na Figura 9A) em DMA na presença de tampão succinato de pH 5,0 para obter uma solução orgânica/aquosa 60/40 e concentrações finais de sulfo-GMBS 3 mM e LDL-DM 3,9 mM. A reação foi incubada por 2 h a 25°C. A mistura sGMBS-LDL-DM bruta foi adicionada a uma solução que contém anticorpo hMAB-A(2I.2) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 misturada com solução 5x de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanossulfônico 300 mM (EPPS) de pH 8,5 e DMA 10% (v/v) a uma razão final entre 3 mol de sGMBS-LDL-DM e 1 mol de anticorpo hMAB-A (2I.2). A reação foi incubada de um dia para o outro a 25°C.

[00425] A reação foi purificada em Acetato 10 mM, Sacarose 9%, Tween-20 0,01%, tampão de formulação de pH 5,0 com o uso de colunas de dessalinização NAP (GE Healthcare) e filtradas através de um filtro de seringa com uma membrana de PVDF de 0,22 µm.

[00426] O conjugado purificado foi constatado como tendo 2,0 mol de LDL-DM/mol de anticorpo por UV-Vis, monômero 99% por SEC, e fármaco livre abaixo de 1% por análise de coluna dupla de SEC/HPLC.

E. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-MAL-LDL-DM

[00427] hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K) é um anticorpo humanizado com

uma sequência de cadeia leve da SEQ ID NO:68 e uma sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO:156.

[00428] O anticorpo hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K) que porta dois resíduos de cisteína não pareados (na posição C442 da região CH3 de cadeia pesada) no estado reduzido foi preparado com o uso de procedimentos padrão e purificado em solução salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4, EDTA 2 mM. A solução de anticorpo reduzida e reoxidada foi usada imediatamente para conjugação com Mal-LDL-DM.

[00429] O anticorpo hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K) reoxidado foi misturado com PBS pH 6,0, EDTA 2 mM e a conjugação foi executada em solução aquosa 90% com N-N-dimetilacetamida 10% (DMA, SAFC) e 5 equivalentes de Mal-LDL-DM (composto 17a). A reação foi incubada de um dia par ao outro a 25°C.

[00430] Pós-reação, o conjugado foi purificado em Acetato 10 mM, sacarose 9%, Tween-20 0,01%, tampão de formulação de pH 5,0 com o uso de colunas de dessalinização NAP (GE Healthcare) e filtradas através de um filtro de seringa com uma membrana de PVDF de 0,22 µm.

[00431] O conjugado purificado foi constatado como tendo 2,0 mol de LDL-DM/mol de anticorpo por UV-Vis, monômero 99% por SEC, e fármaco livre abaixo de 5% por análise de coluna dupla de SEC/HPLC.

F. PREPARAÇÃO DE HMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-SGMBS-LDL-DM

[00432] O anticorpo hMAB-A(2I.2)(YTE/-K) é um anticorpo humanizado com uma sequência de cadeia leve da SEQ ID NO:68 e uma sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO:155.

[00433] Antes da conjugação, sGMBS-LDL-DM foi preparado misturando-se uma solução de estoque de sulfo-GMBS em N-N-dimetilacetamida (DMA, SAFC) com uma solução de estoque de LDL-DM em DMA na presença de tampão succinato de pH 5,0 para obter uma solução orgânica/aquosa 60/40 e concentrações finais de sulfo-GMBS 3

mM e LDL-DM 3,9 mM (composto 14c). A reação foi incubada por 2 h a 25°C. A mistura sGMBS-LDL-DM bruta foi adicionada a uma solução que contém anticorpo hMAB-A(2I.2)(YTE/-K) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 misturada com solução 5x de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanossulfônico 300 mM (EPPS) de pH 8,5 e DMA 10% (v/v) a uma razão final entre 5 mol de sGMBS-LDL-DM e 1 mol de anticorpo hMAB-A(2I.2)(YTE/-K). A reação foi incubada de um dia para o outro a 25°C.

[00434] A reação foi purificada em Acetato 10 mM, Sacarose 9%, Tween-20 0,01%, tampão de formulação de pH 5,0 com o uso de colunas de dessalinização NAP (GE Healthcare) e filtradas através de um filtro de seringa com uma membrana de PVDF de 0,22 µm.

[00435] O conjugado purificado foi constatado como tendo 3,6 mol de LDL-DM/mol de anticorpo por UV-Vis, monômero 99% por SEC, e fármaco livre abaixo de 4% por análise de coluna dupla de SEC/HPLC.

EXEMPLO 12

AFINIDADE DE LIGAÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO

[00436] Para avaliar a consequência da conjugação em ligação de antígeno, a afinidade de ligação relativa de cada ADC anti-ADAM9 e seu respectivo anticorpo não conjugado para ADAM9 foi determinada por análise FACS em células NCI-H1703 que expressam de modo endógeno ADAM9 humana. Brevemente, as células NCI-H1703 que expressam ADAM9 foram incubadas com série de diluição de anticorpos anti-ADAM9 ou ADCs por 30 min a 4°C em tampão FACS (PBS, 0,1% BSA, NaN3 0,01%). As amostras foram, então, lavadas e incubadas com anticorpo secundário identificado de modo fluorescente por 30 minutos a 4°C. A média normalizada de intensidade de fluorescência em cada concentração foi plotada e a EC50 de ligação foi calculada com o uso de uma análise de regressão não linear (GraphPad Prism

7,0). Os resultados destes estudos são resumidos na Tabela 14.

[00437] Todos os anticorpos anti-ADAM9 e ADCs se ligaram com afinidade similar à ADAM9 humana com uma EC_{50} de aproximadamente 0,3 nM medida por citometria de fluxo, indicando que a conjugação não alterou de modo notável a afinidade de ligação de anticorpo na Figura 10.

TABELA 14.

Anticorpo/ADC	**EC_{50} (nM)**
	NCI-H1703
hMAB-A(2I.2)	0,37
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	0,33
hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	0,31
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-MaI-LDL-DM	0,33

EXEMPLO 13

CITOTOXICIDADE IN VITRO DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO

[00438] A citotoxicidade *in vitro* de ADCs anti-ADAM9 com o uso do ligante LDL-DM/carga útil contra três linhas celulares de câncer de pulmão que expressam ADAM9 foi comparada com ADCs de IgG1 não-alvo ou células primeiro bloqueadas com anticorpo não conjugado. Um ADC anti-ADAM9 com o uso da carga útil de DM4 foi incluído para comparação. Especificamente, 500 a 2000 células/poço foram transferidas para placas de 96 poços 24 horas antes do tratamento. Os conjugados foram diluídos no meio de cultura com o uso de série de diluição de 3 vezes e 100 µl foram adicionados por poço. Os poços de controle que contêm células, mas não têm conjugado, juntamente com poços que continham apenas o meio, foram incluídos em cada placa de ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicada para cada ponto de dados. As placas foram incubadas a 37°C numa incubadora de CO_2

5% umidificada por 5 dias. Então, o número relativo de células viáveis em cada poço foi determinado com o uso do Kit 8 de Contagem de Células com base em WST-8. A fração sobrevivente de células em cada poço foi calculada primeiro corrigindo-se a absorbância de fundo de meio e, então, dividindo cada valor pela média dos valores nos poços de controle (células não tratadas). A porcentagem de células sobreviventes foi plotada contra a concentração de conjugado e a EC_{50} da atividade foi calculada com o uso de uma análise de regressão não linear (GraphPad Prism 7.0). Estes resultados são mostrados na Tabela 15 e nas Figuras 11A e 11B. Os conjugados de LDL-DM foram potentes e mostram um intervalo de especificidade maior em comparação com o conjugado de DM4.

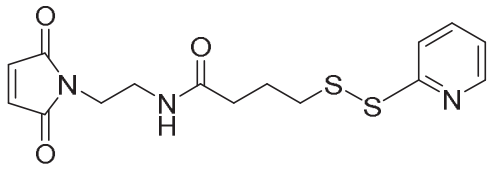
TABELA 15

Linha Celular	**Tipo de Doença**	**ADC anti-ADAM9**	**Citotoxicidade In Vitro por fármaco** (IC_{50} M)	**Especificidade em vezes** (ADC de controle de IC50/ ADC anti-ADAM9 de IC50) Ou (ADC anti-ADAM9 bloqueado de IC50/ADC anti-ADAM9 de IC50)
NCI-H1703	NSCLC – Carcinoma de Células Escamosas	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	7,13E-11	134
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	2,56E-10	>1000
		hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	3,73E-10	>1000
		hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM	3,10E-10	>1000
NCI-H2110	NSCLC – Adenocarcinoma	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	1,65E-09	4,4
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1,20E-08	>1000
Calu-3	NSCLC – Adenocarcinoma	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	3,07E-09	13
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1,42E-09	>1000

EXEMPLO 14

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SCID QUE PORTAM XENOENXERTOS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO DE CÉ-LULAS NÃO PEQUENAS HUMANAS CALU-3

[00439] A atividade antitumoral de 50 µg/kg de carga útil de DM (maitansinoide) de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foram avaliadas em camundongos SCID fêmeas que portam células Calu 3, um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma de pulmão humano. O imunoconjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 compreende o anticorpo hMAB-A(2I.2)-S442C acoplado a DM4 por meio do ligante Mal-SPDB:



(Mal-SPDB)..

[00440] As células Calu-3 foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 106 células Calu-3 em 0,2 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Oitenta e oito camundongos CB.17 SCID fêmeas (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 7 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00441] Cinquenta e seis camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (8 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 78,92 a 123,62 (98,60 ± 12,90, Média ±

SD) mm3. Os camundongos foram medidos e aleatorizados com base no volume de tumor no dia 7 após a implantação. Os camundongos foram dosados no dia 7 após a implantação (19/12/2017). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 16,99 a 21,57 (18,89 ± 0,93, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 a carga útil de DM 50 µg/kg, que é ~2,5 mg/kg de anticorpo para os conjugados de DAR ~3,5 e ~4,3 mg/kg de anticorpo para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 150 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) em 2,6 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) em 2,9 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 4,3 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) em 5,1 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo.

[00442] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi expresso em mm3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00443] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre

o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 58 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 953 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para alcançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é estimado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 16,9 dias com um R2=0,998. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00444] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-trata-

mento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm^3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00445] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 12. Os ADCs de LDL-DM foram todos mais ativos do que suas contrapartes SPDB-DM4. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) teve um valor de inibição de crescimento de tumor (T/C) de 30% (ativo), valor de atraso de crescimento de tumor (T-C) de 34 dias, e um valor de log10 de extermínio de célula (LCK) de 6,7 (++++), com 1 regressão de tumor parcial dentre 8 camundongos e nenhuma regressão completa. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) teve um valor de T/C de 7% (altamente ativo), valor de T-C de >66 dias, e um valor de LCK de >13,0 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 8 camundongos e nenhuma regressão completa. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~3,5. O hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) teve um valor de T/C de 58% (inativo), valor de T-C de 20 dias, e um valor de LCK de 4,0 (++++), com 0 regressões de tumor parciais dentre 8 camundongos e nenhuma regressão completa. hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1,9 DAR) teve um valor de T/C de 15% (ativo), valor de T-C de 47 dias, e um valor de LCK de 9,2 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 8 camundongos e 1 regressão completa. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é more ativo do que hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~2,0. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) teve um valor de T/C de 97% (inativo), valor de T-C de 3 dias, e um valor de LCK de 0,6 (-), com 0 regressões de tumor parciais dentre 8 camundongos e nenhuma regressão completa. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR)

teve um valor de T/C de 15% (ativo), valor de T-C de 39 dias, e um valor de LCK de 7,7 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 8 camundongos e 2 regressões completas. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 a uma DAR ~2,0 com conjugação específica de sítio. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os seis conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo.

[00446] Além disto, ADCs de DAR ~2,0 foram comparativamente ativos como suas contrapartes de DAR ~3,5. Especificamente, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) foi cerca de tão ativo quanto hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8). Visto que a tolerabilidade e a toxicidade são determinadas pela concentração de carga útil, um ADC com DAR 2,0 pode ser dosado a uma concentração de anticorpo mais alta do que um ADC com DAR 3,5. A exposição aumentada do ADC de DAR 2,0 pode melhorar a eficácia saturando-se a disposição de fármaco mediada por alvo (TMDD) e/ou aumentando a penetração de tumor. Os resultados deste estudo sugerem que o conjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) demonstrou atividade antitumoral convincente e é altamente eficaz em modelo de xenoenxerto de tumor de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas Calu-3.

EXEMPLO 15

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SEM PELO QUE PORTAM XENOENXERTOS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS HUMANAS H1703

[00447] A atividade antitumoral de 50 µg/kg de carga útil de DM de

conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi avaliada em camundongos fêmeas sem pelo que porta células H1703, um modelo de xenoenxerto de carcinoma de células escamosas de pulmão de células não pequenas humanas.

[00448] As células H1703 foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 106 células H1703 em 0,2 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Sessenta e seis Camundongos Fêmeas Sem pelo-Foxn1nu atímicos (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 3 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00449] Quarenta e dois camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (6 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 61,84 a 310,17 (128,05 ± 46,61, Média ± SD) mm^3. Os camundongos foram medidos e aleatorizados com base no volume de tumor no dia 26 após a implantação. Os camundongos foram dosados no dia 27 após a implantação (28/12/2017). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 19,69 a 26,59 (23,54 ± 1,61, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 a carga útil de DM 50 µg/kg, que é ~2,5 mg/kg de anticorpo para os conjugados de DAR ~3,5 e ~4,3 mg/kg de

anticorpo para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 150 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) em 2,6 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) em 2,9 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 4,3 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) em 5,1 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo.

[00450] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00451] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 44 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 1206 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para al-

cançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é estimado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 7,60 dias com um R2=0,994. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00452] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00453] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 13. Os ADCs de LDL-DM foram todos mais ativos do que suas contrapartes SPDB-DM4. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) teve um valor de inibição de crescimento de tumor (T/C) de 5% (altamente ativo), atraso de crescimento de tumor (T-C) de 32 dias, e um valor de log10 de extermínio de célula (LCK) de 1,3 (++), com 3 regressões de

tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e 1 sobrevivente livre de tumor. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3,3 DAR) teve um valor de T/C de 0% (altamente ativo), valor de T-C de >85 dias, e um valor de LCK de >3,4 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 6 regressões completas e 5 sobreviventes livres de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~3,5. O hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) teve um valor de T/C de 1% (altamente ativo), valor de T-C de >66 dias, e um valor de LCK de >2,6 (+++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 5 regressões completas e 2 sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1,9 DAR) teve um valor de T/C de 1% (altamente ativo), valor de T-C de 64 dias, e um valor de LCK de 2,5 (+++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 5 regressões completas, e 1 sobrevivente livre de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é tão ativo quanto hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~2,0. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) teve um valor de T/C de 36% (ativo), valor de T-C de 13 dias, e um valor de LCK de 0,5 (-), com 1 regressão de tumor parcial dentre 6 camundongos e nenhuma regressão completa. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) teve um valor de T/C de 1% (altamente ativo), valor de T-C de 38 dias e um valor de LCK de 1,5 (++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 5 regressões completas e 4 sobreviventes livres de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 a uma DAR ~2,0 com conjugação específica de sítio. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os seis conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo.

[00454] Além disto, ADCs de DAR ~2,0 foram comparativamente ativos como suas contrapartes de DAR ~3,5. Especificamente, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) foi cerca de tão ativo quanto hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8). Visto que a tolerabilidade e a toxicidade são determinadas pela concentração de carga útil, um ADC com DAR 2,0 pode ser dosado a uma concentração de anticorpo mais alta do que um ADC com DAR 3,5. A exposição aumentada do ADC de DAR 2,0 pode melhorar a eficácia saturando-se a disposição de fármaco mediada por alvo (TMDD) e/ou aumentando a penetração de tumor. Os resultados deste estudo sugerem que o conjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) demonstrou atividade antitumoral convincente e é altamente eficaz no modelo de xenoenxerto de tumor de câncer de pulmão escamoso de células não pequenas H1703.

EXEMPLO 16

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SEM PELO QUE PORTAM XENOENXERTOS DE CARCINOMA GÁSTRICO HUMANO SNU-5

[00455] A atividade antitumoral de 50 µg/kg de carga útil de DM de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1), hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9), hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8), e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi avaliada em camundongos fêmeas sem pelo que porta células SNU-5, um modelo de xenoenxerto de carcinoma gástrico humano.

[00456] As células SNU-5 foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 10^6 células SNU-5 em 0,1 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na

área no flanco traseiro direito. Sessenta e seis Camundongos Fêmeas Sem pelo-Foxn1nu atímicos (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 6 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00457] Quarenta e dois camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (6 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 61,84 a 310,17 (128,05 ± 46,61, Média ± SD) mm^3. Os camundongos foram medidos e aleatorizados com base no volume de tumor no dia 18 após a implantação. Os camundongos foram dosados no dia 20 após a implantação (07/01/2018). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 19,69 a 26,59 (23,63 ± 1,57, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 a carga útil de DM 50 µg/kg, que é ~2,5 mg/kg de anticorpo para os conjugados de DAR ~3,5 e ~4,3 mg/kg de anticorpo para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 150 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) em 2,6 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) em 2,9 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 4,3 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) em 5,1 mg/kg de anticorpo, hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) em 5,3 mg/kg de anticorpo.

[00458] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi ex-

presso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00459] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 70 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 1122 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para alcançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é estimado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 19,7 dias com um R2=0,986. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00460] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido

duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm^3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00461] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 14. Os ADCs de LDL-DM foram todos mais ativos do que suas contrapartes SPDB-DM4. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 3,6) teve um valor de inibição de crescimento de tumor (T/C) de 66% (inativo), valor de atraso de crescimento de tumor (T-C) de 0 dias, e um valor de log10 de extermínio de célula (LCK) de 0,0 (-), com 2 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos e nenhuma regressão completa. O conjugado hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3,3 DAR) teve um valor de T/C de 14% (ativo), valor de T-C de 45 dias, e um valor de LCK de 0,7 (+), com 4 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e 1 sobrevivente livre de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~3,5. O hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) teve um valor de T/C de 47% (inativo), valor de T-C de 10 dias, e um valor de LCK de 0,2 (-), com 1 regressão de tumor parcial dentre 6 camundongos, 1 regressão completa, e 1 sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1,9 DAR) teve um valor de T/C de

41% (ativo), valor de T-C de 10 dias, e um valor de LCK de 0,2 (-), com 2 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e 1 sobrevivente livre de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 em DAR ~2,0. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (DAR 1,8) teve um valor de T/C de 107% (inativo), valor de T-C de -11 dias, e um valor de LCK de -0,2 (-), com 1 regressão de tumor parcial dentre 6 camundongos, 1 regressão completa, e 1 sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) teve um valor de T/C de 22% (ativo), valor de T-C de 28 dias, e um valor de LCK de 0,4 (-), com 2 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e 1 sobrevivente livre de tumor. Isto demonstra que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM é mais ativo do que hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 a uma DAR ~2,0 com conjugação específica de sítio. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os seis conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo.

[00462] Além disto, ADCs de DAR ~2,0 foram comparativamente ativos como suas contrapartes de DAR ~3,5. Especificamente, hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 3,3) foi cerca de tão ativo quanto hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (DAR 1,9) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 1,8). Visto que a tolerabilidade e a toxicidade são determinadas pela concentração de carga útil, um ADC com DAR 2,0 pode ser dosado a uma concentração de anticorpo mais alta do que um ADC com DAR 3,5. A exposição aumentada do ADC de DAR 2,0 pode melhorar a eficácia saturando-se a disposição de fármaco mediada por alvo (TMDD) e/ou aumentando a penetração de tumor. Os resultados deste estudo sugerem que o conjugado hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) demonstrou atividade antitumoral e é

eficaz em modelo de xenoenxerto de tumor de carcinoma gástrico SNU-5.

EXEMPLO 17

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SCID QUE PORTAM XENOENXERTOS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS HUMANAS EBC-1

[00463] A atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) foram avaliadas em camundongos fêmeas SCID que portam células EBC-1, um modelo de xenoenxerto de carcinoma de células escamosas de pulmão de células não pequenas humanas.

[00464] As células EBC-1 foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 10^6 células EBC-1 em 0,2 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Sessenta e seis camundongos CB.17 SCID fêmeas (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 6 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00465] Quarenta e dois camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (6 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 79,38 a 124,29 (95,81 ± 11,83, Média ± SD) mm^3. Os camundongos foram medidos, aleatorizados e dosados com base no volume de tumor no dia 7 após a implantação (16/04/2018). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 15,94 a 21,10 (18,55 ± 1,17, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A adminis-

tração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 em 25, 50 ou 100 µg/kg de carga útil de DM, que é ~2, 4 e 9 mg/kg de anticorpo (Ab) para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 200 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 2,18, 4,36 e 8,76 mg/kg de Ab, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) em 2,14, 4,28 e 8,57 mg/kg de Ab.

[00466] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00467] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 28 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 1279 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para al-

cançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é estimado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 6,04 dias com um R2=0,995. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00468] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm^3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00469] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 15. O ADC de LDL-DM foi mais ativo do que a contraparte SPDB-DM4. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,18 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 17% (ativo), valor de T-C de 21 dias e um valor de LCK de 1,06 (+), sem regressões de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1)

dosado em 50 µg/kg de DM (4,36 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 2% (altamente ativo), valor de T-C de 34 dias, e um valor de LCK de 1,68 (++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,76 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 2% (altamente ativo), valor de T-C de >65 dias, e um valor de LCK de >3,26 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 6 regressões completas e 2 sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,14 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 2% (altamente ativo), valor de T-C de 56 dias e um valor de LCK de 2,79 (+++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 3 regressões completas e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 50 µg/kg de DM (4,28 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 2% (altamente ativo), valor de T-C de >65 dias e um valor de LCK de >3,26 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 6 regressões completas, e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 1% (altamente ativo), valor de T-C de >65 dias e um valor de LCK de >3,26 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 6 regressões completas e 6 sobreviventes livres de tumor. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os seis conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo. Os resultados deste estudo sugerem que ambos os conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) demonstraram atividade antitumoral dependente de dose e foram eficazes em modelo de xenoenxerto de tumor de carcinoma de células

escamosas de pulmão de células não pequenas EBC-1.

EXEMPLO 18

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SEM PELO CD1 QUE PORTAM XENOENXERTOS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL HUMANO SW48

[00470] A atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) e 100 ug/kg de carga útil de DM para o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) de controle não ligante foi avaliada em camundongos imunodeficientes sem pelos CD1 fêmeas que portam células SW48, um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma colorretal humano.

[00471] As células SW48 (ATCC CCL-231) foram colhidas para inoculação, com mais do que 90% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 10^6 células SW48 em 0,1 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Camundongos Fêmea Sem Pelo CD1 (5 a 7 semanas de idade) foram obtidos a partir de Charles Rivers Laboratories. Mediante recebimento, os animais foram observados por 3 a 4 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00472] Quarenta camundongos foram aleatorizados em 5 grupos (8 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 121,33 a 186,59 (152,49 ± 18,50, Média ± SD) mm^3 no dia 19 pós-implantação. Os camundongos foram medidos e aleatorizados com base no volume de tumor no dia 19 e dosados no dia 21 pós-implantação. O peso corporal dos camundongos no dia 19 esteve na faixa de 18,80 a 29,90 (25,75 ± 2,50, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de

marca auricular. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso por injeção em veia caudal com o uso de uma seringa de 0,5 ml ajustada com uma agulha de calibre 28, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 em 25, 50 ou 100 µg/kg de carga útil de DM, que é equivalente a ~2, 4 e 9 mg/kg de anticorpo (Ab) para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (1X PBS, 100 µl), hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) em 2,18, 4,36 e 8,57 mg/kg de Ab, e huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) em 8,57 mg/kg de Ab.

[00473] O tamanho de tumor foi medido uma vez por semana por medições ortogonais com o uso de pinças eletrônicas e medido duas vezes por semana assim que os grupos foram dosados. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou mais a partir do dia de dosagem, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pôde ser detectado (≤14,08 mm^3) para três a quatro medições consecutivas e como sobreviventes livres de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado (≤14,08 mm^3) no fim do estudo. O volume de tumor foi registrado no software Study Director.

[00474] A inibição de crescimento de tumor (% de T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o ponto no tempo quando todos os animais de controle de veículo permanecem no estudo). A % de T/C foi calculada no dia 56 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 663,04 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um

alto nível de atividade antitumoral.

[00475] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido uma vez por semana antes da dosagem e medido duas vezes por semana após a dosagem como um índice bruto de toxicidade de fármaco e foi registrado no software Study Director. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 2000 mm^3, os tumores mostraram sinais de ulceração significativa ou necrose, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00476] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 16. hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) foi altamente ativo numa dose de 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) com 8/8 camundongos com regressão parcial, 7/8 camundongos com regressão completa, 7/8 camundongos sobreviventes livres de tumor e um % de T/C de 1%. Em um nível de dose de 50 µg/kg de DM (4,36 mg/kg de Ab), hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi ativo com regressão parcial de 5/8 camundongos, regressão completa de 2/8 camundongos, sobreviventes livres de tumor de 2/8 camundongos, e uma % de T/C de 15%. hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi considerado inativo pelos padrões NCI em 25 µg/kg de DM (2,18 mg/kg de Ab) com regressão parcial de 1/8 camundongos, regressão completa 0/8 de camundongos, sobreviventes livres de tumor de 0/8 camundongos, e % de T/C em 51%. Os resultados demonstraram que

hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi alvejado por ADAM9 visto que o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) não ligante de controle foi inativo numa dose de 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) com 0/8 regressão parcial, 0/8 regressão completa, 0/8 sobreviventes livres de tumor e uma % de T/C de 93%. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo. Os resultados deste estudo sugerem que o conjugado hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) demonstrou atividade antitumoral alvejada dependente de dose e foi eficaz em um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma colorretal SW48.

EXEMPLO 19

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SEM PELO CD1 QUE PORTAM XENOENXERTOS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO HUMANO HPAF-II

[00477] A atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) e 100 ug/kg de carga útil de DM para o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) de controle não ligante foi avaliada em camundongos imunodeficientes sem pelos CD1 fêmeas que portam células HPAF-II, um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma pancreático humano.

[00478] As células HPAF-II (ATCC CRL-1997) foram colhidas para inoculação, com mais do que 90% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 10^6 células HPAF-II em 0,1 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Camundongos Fêmea Sem Pelo CD1 (5 a 7 semanas de idade) foram obtidos a partir de Charles Rivers Laboratories. Mediante recebimento, os ani-

mais foram observados por 3 a 4 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00479] Trinta e cinco camundongos foram aleatorizados em 5 grupos (7 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 81,64 a 136,77 (104,94 ± 13,89, Média ± SD) mm^3 no dia 15 pós-implantação. Os camundongos foram medidos e aleatorizados com base no volume de tumor no dia 15 e dosados no dia 16 pós-implantação. O peso corporal dos camundongos no dia 15 esteve na faixa de 21,00 a 28,60 (25,21 ± 1,70, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de marca auricular. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso por injeção em veia caudal com o uso de uma seringa de 0,5 ml ajustada com uma agulha de calibre 28, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 em 25, 50 ou 100 µg/kg de carga útil de DM, que é equivalente a ~2, 4 e 9 mg/kg de anticorpo (Ab) para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (1X PBS, 100 µl), hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) em 2,18, 4,36 e 8,57 mg/kg de Ab, e huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) em 8,57 mg/kg de Ab.

[00480] O tamanho de tumor foi medido uma vez por semana por medições ortogonais com o uso de pinças eletrônicas e medido duas vezes por semana assim que os grupos foram dosados. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou mais a partir do dia de dosagem, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pôde ser detectado (≤14,08 mm^3) para três a quatro medições consecutivas e como

sobreviventes livres de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado (≤14,08 mm^3) no fim do estudo. O volume de tumor foi registrado no software Study Director.

[00481] A inibição de crescimento de tumor (% de T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o momento quando todos os animais de controle de veículo permanecem no estudo). A % de T/C foi calculada no dia 47 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 882,83 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral.

[00482] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido uma vez por semana antes da dosagem e medido duas vezes por semana após a dosagem como um índice bruto de toxicidade de fármaco e foi registrado no software Study Director. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 2000 mm^3, os tumores mostraram sinais de ulceração significativa ou necrose, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00483] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 17. hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR) foi altamente ativo

numa dose de 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) com 7/7 camundongos com regressão parcial, 3/7 camundongos com regressão completa, 3/7 camundongos sobreviventes livres de tumor e um % de T/C de 3%. Em um nível de dose de 50 µg/kg de DM (4,36 mg/kg de Ab), hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi ativo com regressão parcial de 5/7 camundongos, regressão completa de 1/7 camundongos, sobreviventes livres de tumor de 1/7 camundongos, e uma % de T/C de 11%. hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi considerado inativo pelos padrões NCI em 25 µg/kg de DM (2,18 mg/kg de Ab) com regressão parcial de 0/7 camundongos, regressão completa 0/7 de camundongos, sobreviventes livres de tumor de 0/7 camundongos, e % de T/C em 56%. Os resultados demonstraram que hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) foi alvejado por ADAM9 visto que o conjugado huKTI-Mal-LDL-DM (DAR 2,0) de controle não ligante foi considerado inativo pelos padrões NCI numa dose de 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) com 0/7 regressão parcial, 0/7 regressão completa, 0/7 sobreviventes livres de tumor e uma % de T/C de 48%. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo. Os resultados deste estudo sugeriram que o conjugado hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (DAR 1,8) demonstrou atividade antitumoral alvejada dependente de dose e foi eficaz em um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma pancreático HPAF-II.

EXEMPLO 20

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SEM PELO QUE PORTAM XENOENXERTOS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS HUMANAS H1975

[00484] A atividade antitumoral de 25, 50, e 100 µg/kg de carga útil

de DM de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) foi avaliada em camundongos fêmeas sem pelo que portam células H1975, um modelo de xenoenxerto de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas humanas.

[00485] As células H1975 foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 3 x 10^6 células H1975 em 0,2 ml de Matrigel 50%/meio livre de soro 50% por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Sessenta e seis Camundongos Fêmeas Foxn1^{nu} atímicos (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 7 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00486] Quarenta e dois camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (6 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 79,43 a 119,61 (92,44 ± 10,36, Média ± SD) mm^3. Os camundongos foram medidos, aleatorizados e dosados com base no volume de tumor no dia 7 após a implantação (10/04/2018). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 18,87 a 26,30 (22,92 ± 1,50, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5 centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 em 25, 50 ou 100 µg/kg de carga útil de DM, que é ~2, 4 e 9 mg/kg de anticorpo (Ab) para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 200 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 2,18, 4,36 e 8,76 mg/kg de Ab, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM

(DAR 2,1) em 2,14, 4,28 e 8,57 mg/kg de Ab.

[00487] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00488] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 20 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 729 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para alcançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é estimado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 3,84 dias com um R2=0,998. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para

LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00489] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm^3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00490] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 18. O ADC de LDL-DM foi mais ativo do que a contraparte ADC de SPDB-DM4. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,18 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 26% (ativo), valor de T-C de 10 dias, e um valor de LCK de 0,79 (+), sem regressões de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 50 µg/kg de DM (4,36 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 8% (altamente ativo), valor de T-C de 35 dias, e um valor de LCK de 2,72 (+++), com 5 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,76 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 7% (altamente ativo), valor de T-C de >38 dias e um valor de LCK de >2,98 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, nenhuma re-

gressão completa, e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,14 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 6% (altamente ativo) com 4 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 1 regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. Os valores de T-C e LCK não puderam ser calculados por conta da perda de animais neste grupo devido a necrose de tumor ou perda de peso corporal em nadir de 7% (10 dias após a injeção, 1 animal no grupo precisou ser submetido à eutanásia devido à perda de peso corporal >20%). hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 50 µg/kg de DM (4,28 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 4% (altamente ativo) com 5 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, nenhuma regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. Os valores de T-C e LCK não precisaram ser calculados por conta da perda de animais neste grupo devido à perda de peso corporal em nadir de 35% (20 dias após a injeção, todos os animais neste grupo precisaram ser submetidos à eutanásia devido à perda de peso corporal >20% devido a uma obstrução da garrafa de água). hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 6% (altamente ativo), valor de T-C de >38 dias e um valor de LCK de >2,98 (++++), com 6 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, 2 regressões completas e 2 sobreviventes livres de tumor. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em qualquer uma das doses indicadas ou com hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) na dose mais alta de 100 µg/kg e, deste modo, ambos os conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo. Os resultados deste estudo sugerem que ambos os conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) demonstraram atividade antitumoral dependente de dose e foram

eficazes em modelo de xenoenxerto de tumor de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas H1975.

EXEMPLO 21

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-ADAM9-FÁRMACO EM CAMUNDONGOS SCID QUE PORTAM XENOENXERTOS DE CARCINOMA GÁSTRICO HUMANO HS 746T

[00491] A atividade antitumoral de 25, 50 e 100 µg/kg de carga útil de DM de conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) foi avaliada em camundongos fêmeas SCID que portam células Hs 746T, um modelo de xenoenxerto de carcinoma gástrico humano.

[00492] As células Hs 746T foram colhidas para inoculação, com 100% de viabilidade determinada por exclusão de azul de tripano. Os camundongos foram inoculados com 5 x 10^6 células Hs 746T em 0,1 ml de meio livre de soro por injeção subcutânea na área no flanco traseiro direito. Sessenta camundongos CB.17 SCID fêmeas (6 semanas de idade) foram obtidos. Mediante recebimento, os animais foram observados por 7 dias antes da iniciação de estudo. Os animais não mostraram sinal de doença ou enfermidade mediante chegada ou antes do tratamento.

[00493] Quarenta e dois camundongos foram aleatorizados em 7 grupos (6 camundongos por grupo) por volume de tumor. Os volumes de tumor estiveram na faixa de 69,09 a 136,75 (101,40 ± 19,16, Média ± SD) mm^3. Os camundongos foram medidos, aleatorizados e dosados com base no volume de tumor no dia 13 após a implantação (11/07/2018). O peso corporal dos camundongos esteve na faixa de 18,03 a 23,21 (19,66 ± 1,21, Média ± SD) gramas. Os camundongos em cada grupo foram identificados por método de punção. A administração dos agentes de teste e veículo foram executados de modo intravenoso usando-se uma seringa de 1,0 ml ajustada com uma agulha de calibre 27, 1,5

centímetro (½ polegada). Os agentes de teste de conjugado de anticorpo-fármaco foram dosados qdx1 em 25, 50 ou 100 µg/kg de carga útil de DM, que é ~2, 4 e 9 mg/kg de anticorpo (Ab) para os conjugados de DAR ~2,0. Os grupos incluíram: um grupo de controle dosado com veículo (PBS, 200 µl), hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) em 2,18, 4,36 e 8,76 mg/kg de Ab, e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) em 2,14, 4,28 e 8,57 mg/kg de Ab.

[00494] O tamanho de tumor foi medido duas vezes por semana em três dimensões com o uso de uma pinça. O volume de tumor foi expresso em mm^3 com o uso da fórmula Volume = Comprimento x Largura x Altura x ½. Um camundongo foi considerado como tendo uma regressão parcial (PR) quando o volume de tumor foi reduzido por 50% ou maior, uma regressão de tumor completa (CR) quando nenhum tumor palpável pode ser detectado, e como um sobrevivente livre de tumor (TFS) se nenhum tumor palpável foi detectado no fim do estudo. O volume de tumor foi determinado pelo software StudyLog.

[00495] A inibição de crescimento de tumor (%T/C) é a razão entre o volume de tumor mediano (TV) do grupo de tratamento (T) e o TV mediano do grupo de controle (C) em um tempo predeterminado (por exemplo, o tempo quando o TV mediano para tumores de controle alcança um volume de tumor máximo de ~1000 mm^3, que é quando os camundongos são submetidos à eutanásia). A % de T/C foi calculada no dia 25 pós-inoculação, quando o TV mediano do grupo de controle alcançou 1536 mm^3. De acordo com os padrões NCI, uma T/C ≤ 42% é o nível mínimo de atividade antitumoral e uma T/C <10% é considerada um alto nível de atividade antitumoral. O atraso de crescimento de tumor (T-C), é a diferença entre o tempo mediano (em dias) para o grupo de tratamento (T) e tumores de grupo de controle (C) para alcançar um tamanho predeterminado de 1000 mm^3 (sobreviventes livres de tumor excluídos). O tempo de duplicação de tumor (Td) é es-

timado a partir do ajuste de curva exponencial de mediana diária de crescimento de tumor de controle e determinado pelo software StudyLog. Td foi 3,38 dias com um R2=0,991. O Log10 de extermínio de célula (LCK) é calculado com a fórmula LCK = (T – C) / Td x 3,32, em que 3,32 é o número de duplicações por log de crescimento de célula. Os critérios de atividade de Southern Research Institute (SRI) para LCK são <0,7: - (inativo), 0,7 a 1,2: +, 1,3 a 1,9: ++, 2,0 a 2,8: +++, >2,8: ++++ (altamente ativo).

[00496] O peso corporal (BW) de todos os camundongos foi medido duas vezes por semana como um índice estreito de toxicidade de fármaco e foi determinado pelo software StudyLog. Os pesos corporais de camundongos foram expressos como porcentagem de mudança em peso corporal a partir do peso corporal pré-tratamento conforme a seguir: % de mudança de BW = [(BWpós/BWpré) – 1] x 100, em que BWpós é o peso após o tratamento e BWpré é o peso corporal inicial antes do tratamento. A porcentagem de perda de peso corporal (BWL) foi expressa como a mudança média em peso corporal pós-tratamento. Os animais foram submetidos à eutanásia se o volume de tumor se tornou maior do que 1000 mm^3, se os tumores se tornaram necróticos, os camundongos perderam >20% de seu peso corporal inicial, ou os camundongos se tornaram moribundos em qualquer momento durante o estudo.

[00497] Os resultados do estudo são mostrados na Figura 19. O ADC de LDL-DM foi mais ativo do que a contraparte ADC de SPDB-DM4. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,18 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 77% (inativo), valor de T-C de 1 dia e um valor de LCK de 0,12 (-), com nenhuma regressão de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 50 µg/kg de DM (4,36 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 67% (inativo), valor de T-C de 3 dias e um valor de LCK

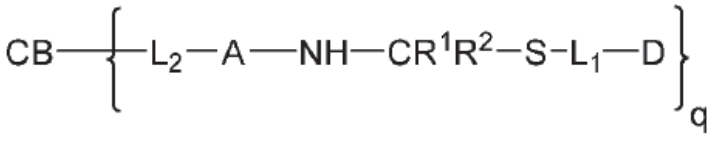
de 0,24 (-), com nenhuma regressão de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,76 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 12% (ativo), valor de T-C de 15 dias e um valor de LCK de 1,35 (++), com 1 regressão de tumor parcial dentre 6 camundongos, nenhuma regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 25 µg/kg de DM (2,14 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 58% (inativo), valor de T-C de 4 dias e um valor de LCK de 0,33 (-), com nenhuma regressão de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 50 µg/kg de DM (4,28 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 26% (ativo), valor de T-C de 12 dias e um valor de LCK de 1,09 (+), com nenhuma regressão de tumor ou sobreviventes livres de tumor. hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) dosado em 100 µg/kg de DM (8,57 mg/kg de Ab) teve um valor de T/C de 6% (altamente ativo), valor de T-C de 29 dias e um valor de LCK de 2,59 (+++), com 4 regressões de tumor parciais dentre 6 camundongos, nenhuma regressão completa e nenhum sobrevivente livre de tumor. Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada com qualquer um dos ADCs nas doses indicadas e, deste modo, todos os seis conjugados foram bem tolerados em camundongos neste estudo. Os resultados deste estudo sugerem que ambos os conjugados hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (DAR 2,1) e hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (DAR 2,1) demonstraram atividade antitumoral dependente de dose e foram eficazes em modelo de xenoenxerto de tumor de carcinoma gástrico Hs 746T.

[00498] Todas as publicações e patentes mencionadas neste relatório descritivo são no presente documento incorporadas por referência na mesma extensão que se cada publicação individual ou pedido de patente específica e individualmente indicado fosse incorporado por referência, em sua totalidade. Embora a invenção tenha sido descrita

em conexão com modalidades específicas da mesma, será entendido que a mesma é capaz de modificações adicionais e esta aplicação é destinada a cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção que seguem, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais afastamentos da presente invenção que estão dentro da prática conhecida ou costumeira na técnica à qual a invenção pertence e pode ser aplicada aos recursos essenciais apresentados anteriormente no presente documento.

REIVINDICAÇÕES

1. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula:

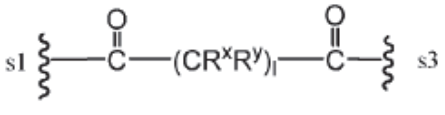


(I)

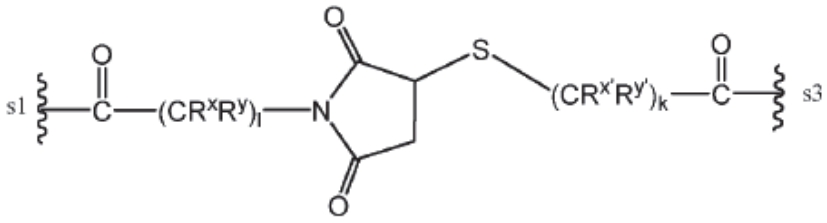
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em que:

CB é um anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo;

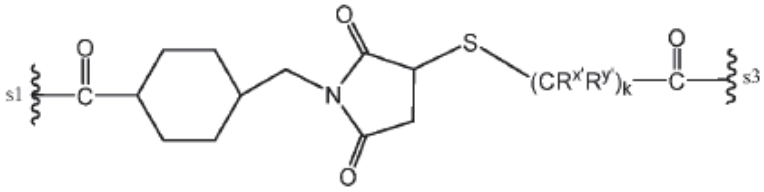
L_2 é representado por uma das seguintes fórmulas: em que:



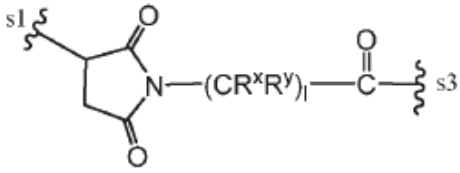
(L2a),



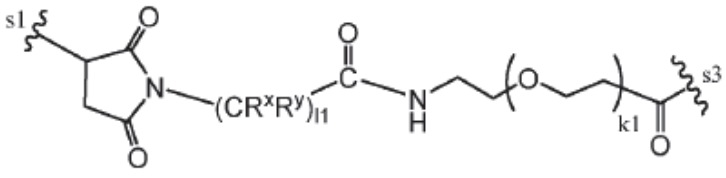
(L2b),



(L2c),



(L2d), ou



(L2e);

em que:

R^x, R^y, $R^{x'}$ e $R^{y'}$, para cada ocorrência, são, independentemente, H, -OH, halogênio, - O-(C_{1-4} alquila), $-SO_3H$, $-NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, ou

uma C_{1-4} alquila opcionalmente substituída por -OH, halogênio, SO_3H ou $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, em que R_{40}, R_{41} e R_{42} são, cada um, independentemente, H ou uma C_{1-4} alquila;

l e k são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 10;

l1 é um número inteiro de 2 a 5;

k1 é um número inteiro de 1 a 5; e

s1 indica o sítio conectado ao agente de ligação de célula CB e s3 indica o sítio conectado ao grupo A;

A é um resíduo de aminoácido ou um peptídeo que compreende 2 a 20 resíduos de aminoácido;

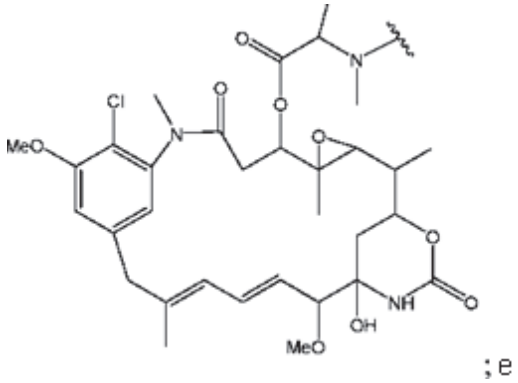
R^1 e R^2 são, cada um, independentemente, H ou uma C_{1-3}alquila;

L_1 é representado pela seguinte fórmula:

$-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$

em que R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me, e a porção química -C(=O)- em L_1 é conectada a D;

D é representado pela seguinte fórmula:



; e

q é um número inteiro de 1 a 20.

2. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^x, R^y, $R^{x'}$ e $R^{y'}$ são todos H; e l e k são, cada um, independentemente, um número inteiro de 2 a 6.

3. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que A é um peptídeo que contém 2 a 5 resí-

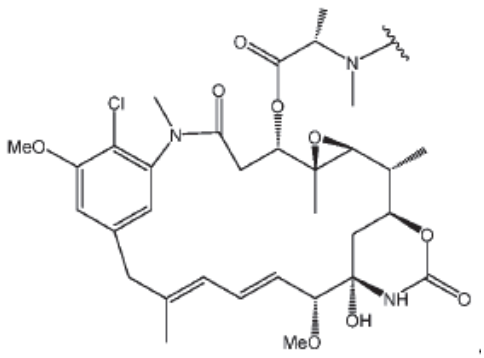
duos de aminoácido.

4. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que A é selecionado do grupo que consiste em Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, D-Val-Ala, Val-Cit, D-Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosyl-Arg, Phe-N^9- nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala-D-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 144), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 145), Gly-Phe- Leu-Gly (SEQ ID NO: 146), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D- Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gin-Val, Asn-Ala, Gln-Phe, Gin-Ala, D-Ala-Pro, e D-Ala-tBu-Gly, em que o primeiro aminoácido em cada peptídeo é conectado ao grupo L_2 e o último aminoácido em cada peptídeo é conectado a -NH-CR^1R^2-S-L_1-D.

5. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que R^1 e R^2 são, ambos, H.

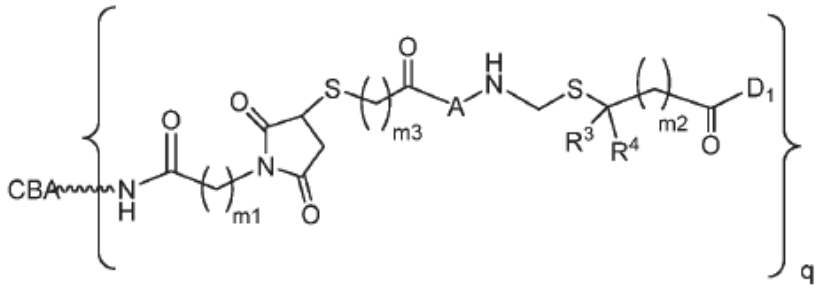
6. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que L_1 é -$(CH_2)_{4-6}$-C(=O)-.

7. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que D é representado pela seguinte fórmula:

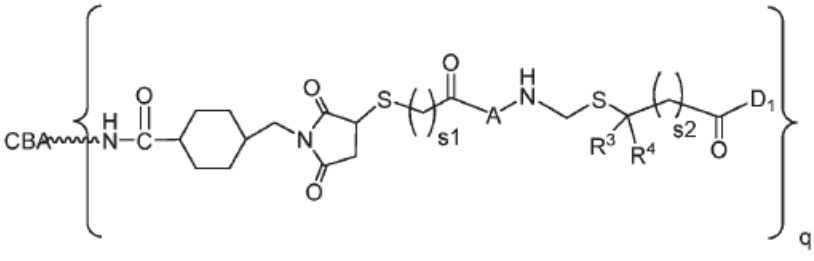


8. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é

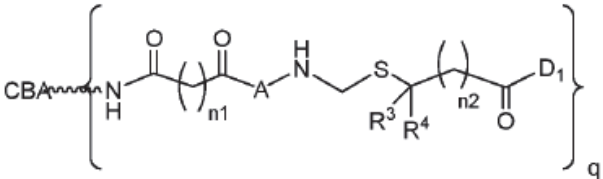
representado pela seguinte fórmula:



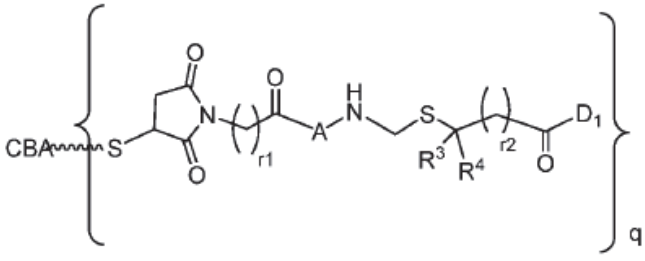
q (Ia);



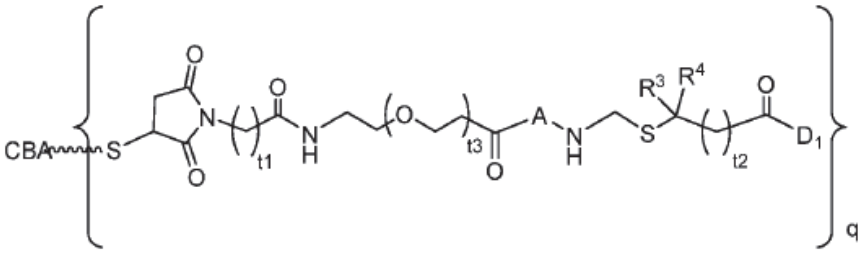
q (Ib);



q (Ic);



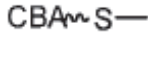
q (Id); ou



q (Ie);

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

é o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo conectado ao grupo L_2 através de um grupo Lys amina;

 é o anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de liga-

ção a ADAM9 do mesmo conectado ao grupo L_2 através de um grupo Cys tiol;

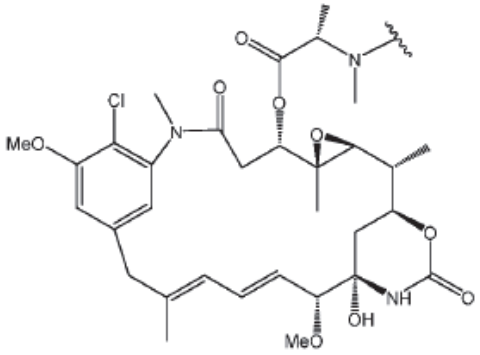
R^3 e R^4 são, cada um, independentemente, H ou Me;

m1, m3, n1, r1, s1 e t1 são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 6;

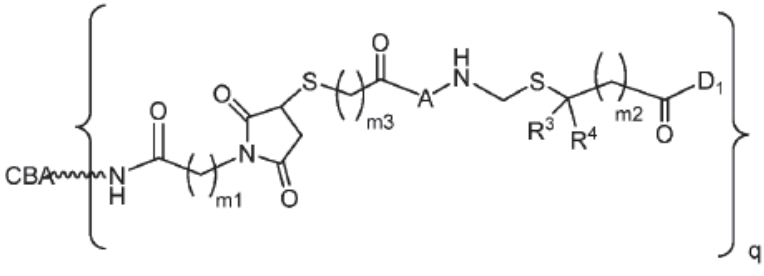
m2, n2, r2, s2 e t2 são, cada um, independentemente, um número inteiro de 1 a 7;

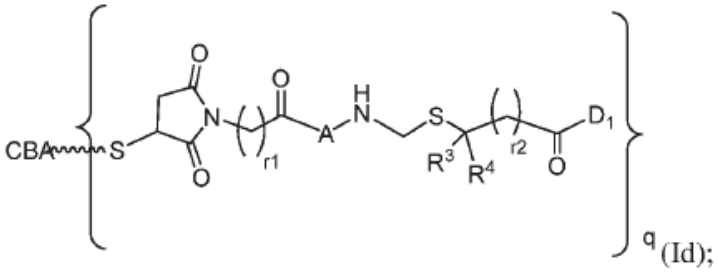
t3 é um número inteiro de 1 a 12;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



9. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:





em que:

m1 e m3 são, cada um, independentemente, um número

inteiro de 2 a 4;

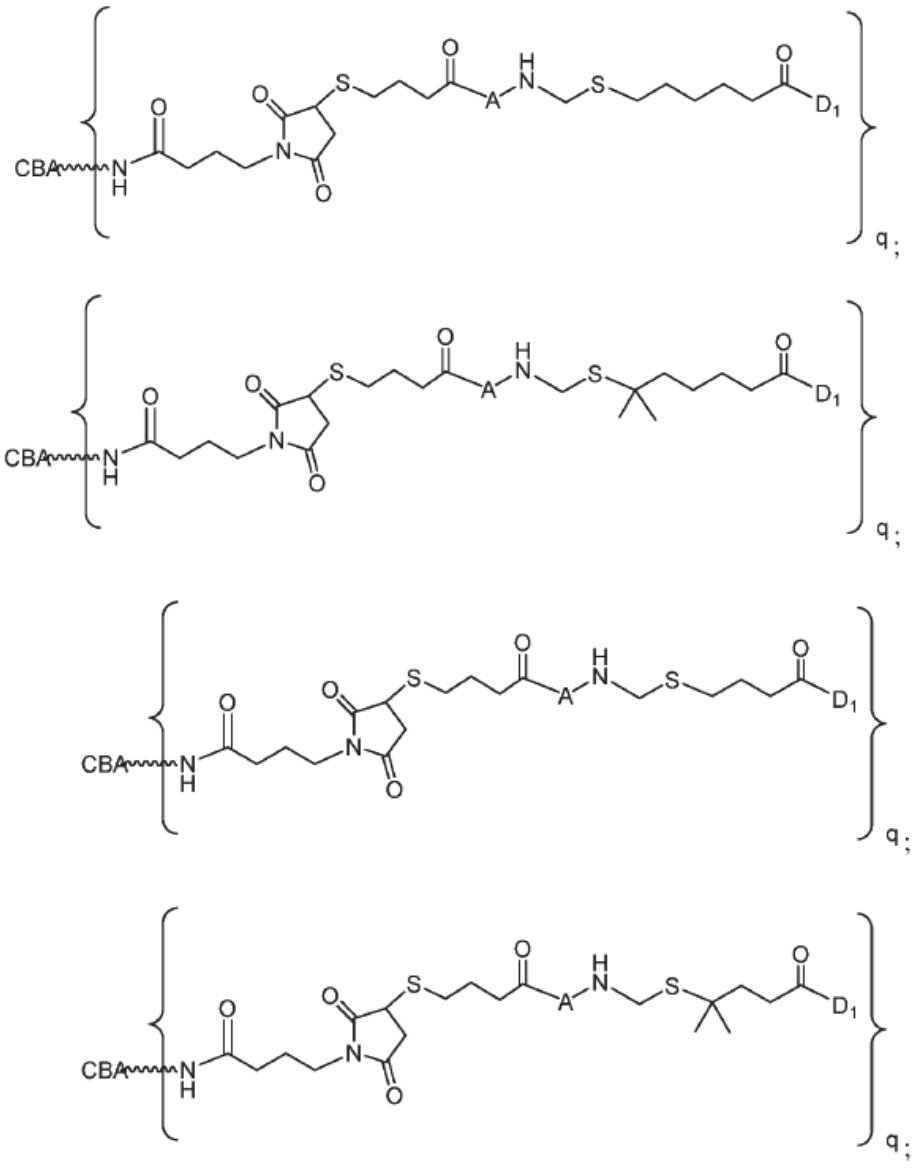
m2 é um número inteiro de 2 a 5;

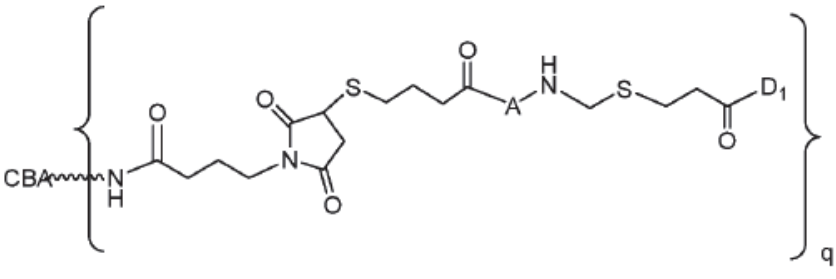
r1 é um número inteiro de 2 a 6; e

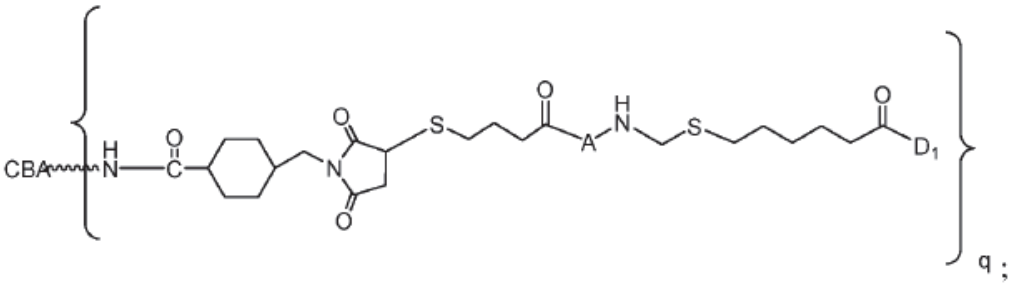
r2 é um número inteiro de 2 a 5.

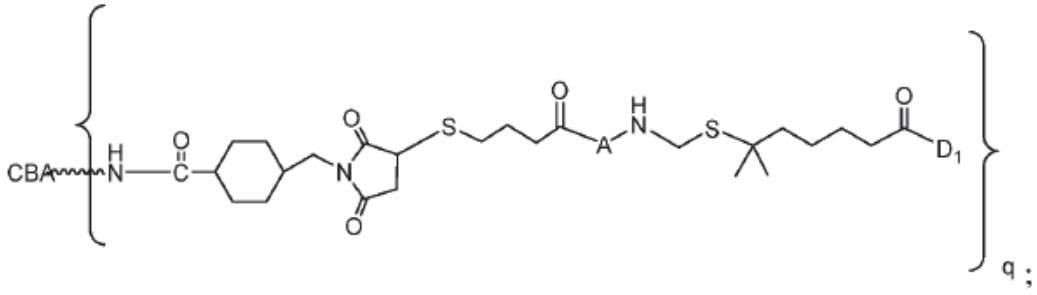
10. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que A é Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro ou D-Ala-tBu-Gly.

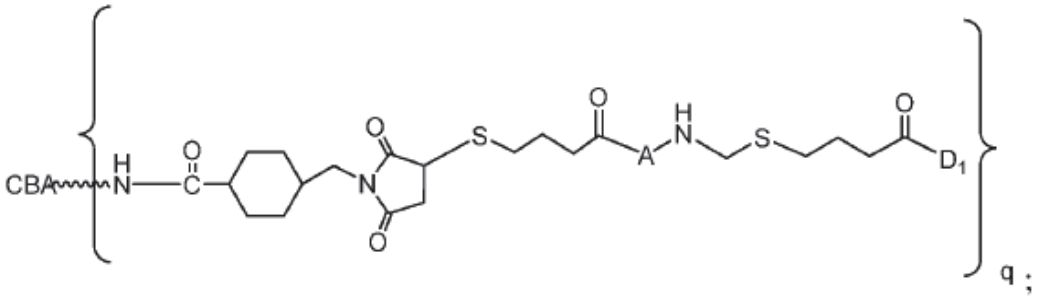
11. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:

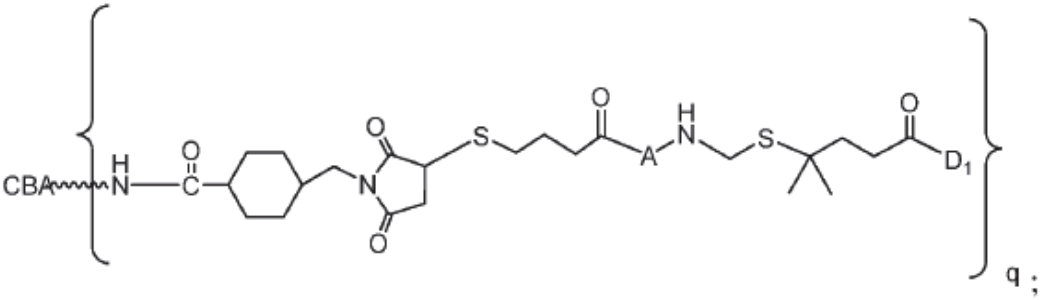


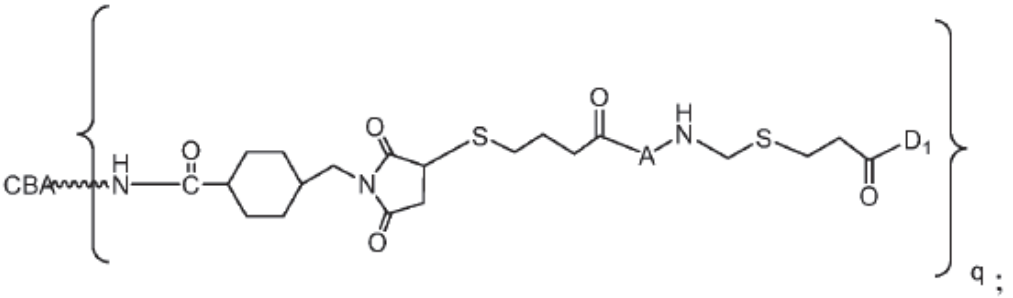




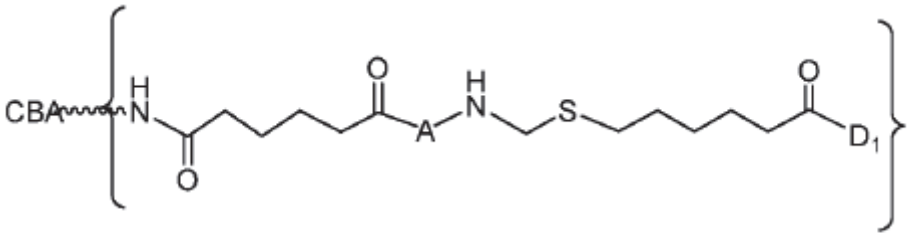




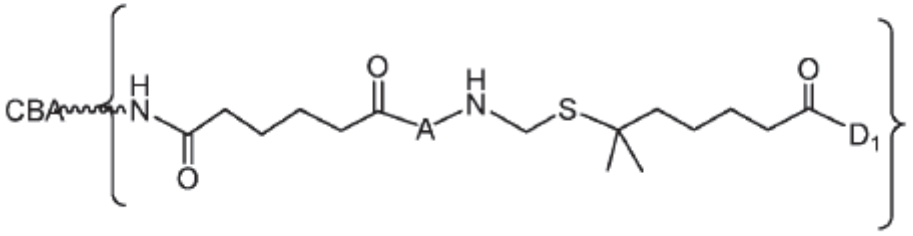




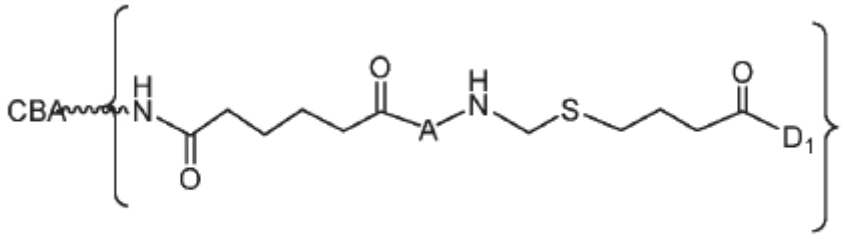
q ;



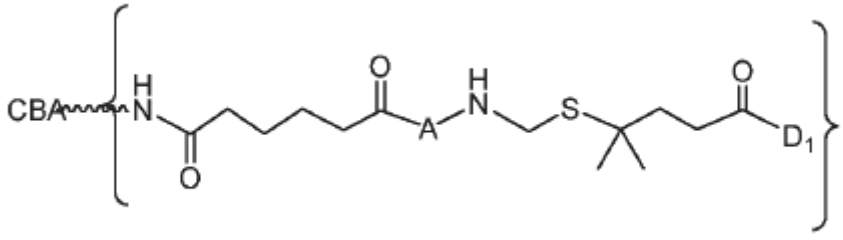
q ;



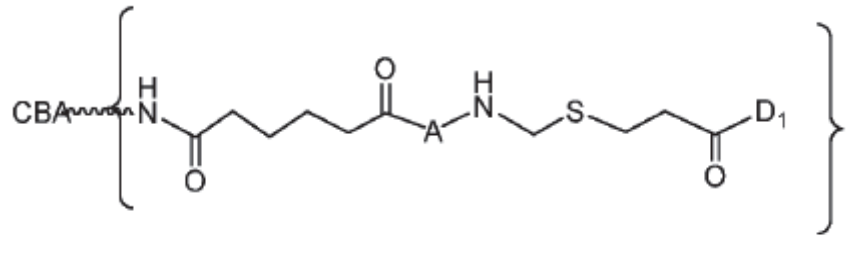
q ;



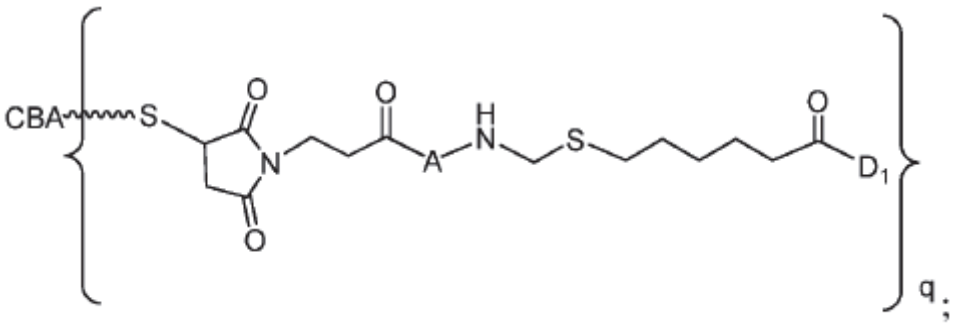
q ;



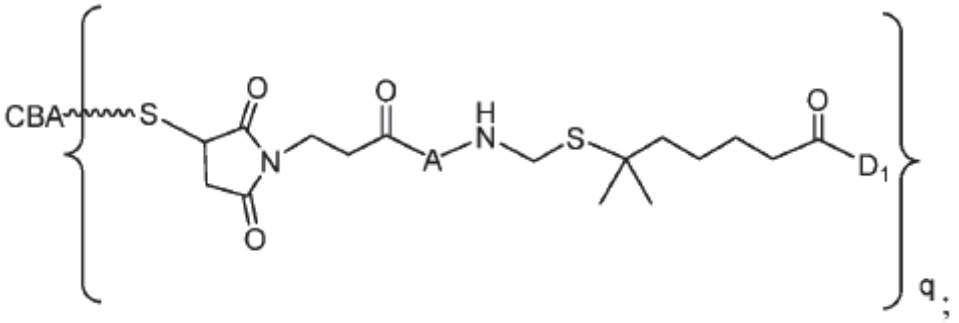
q ;



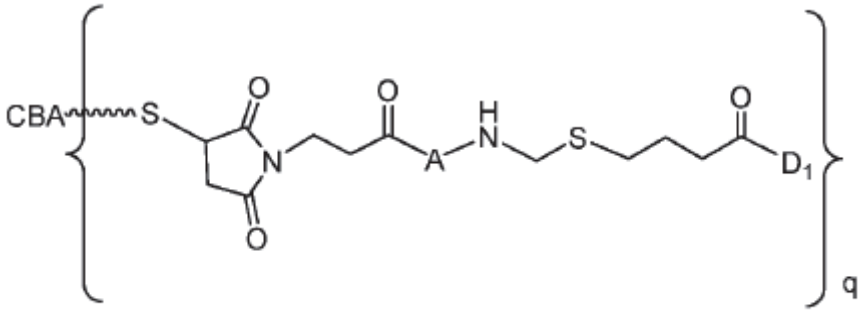
q;



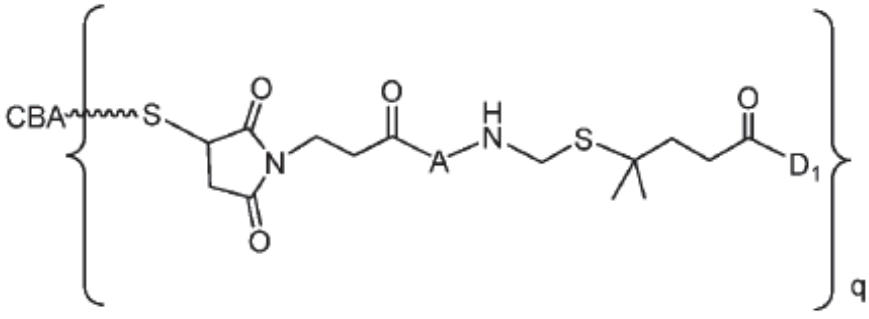
q;



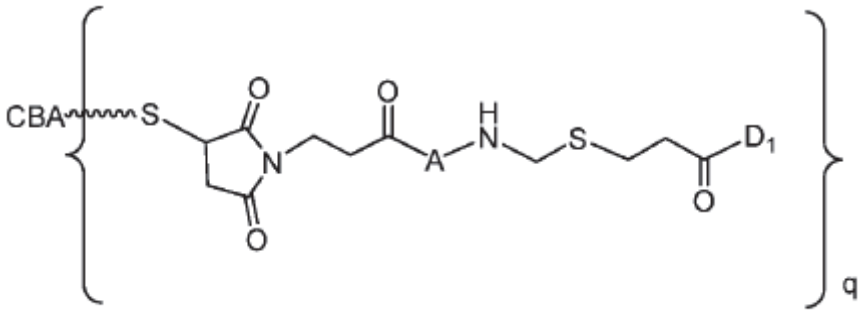
q;

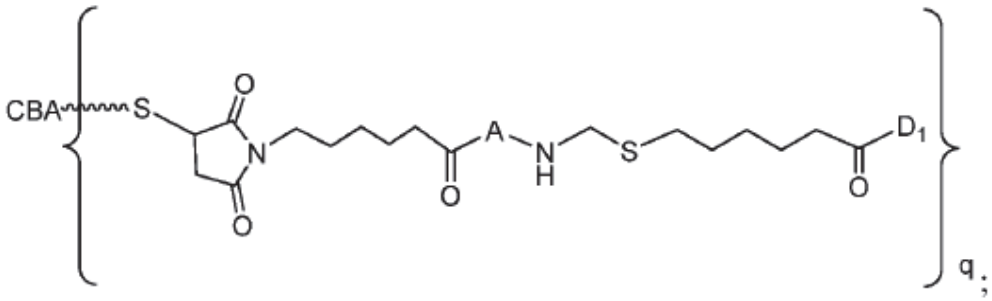


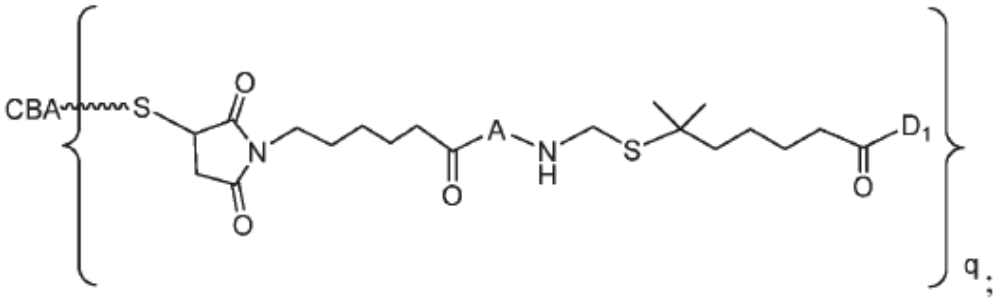
q;

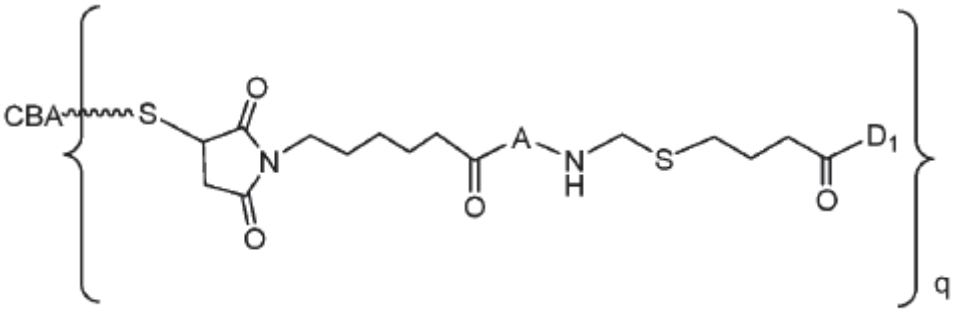


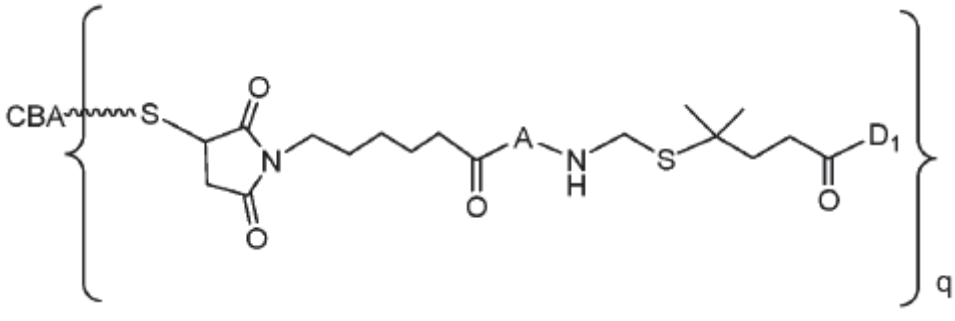
q; ou

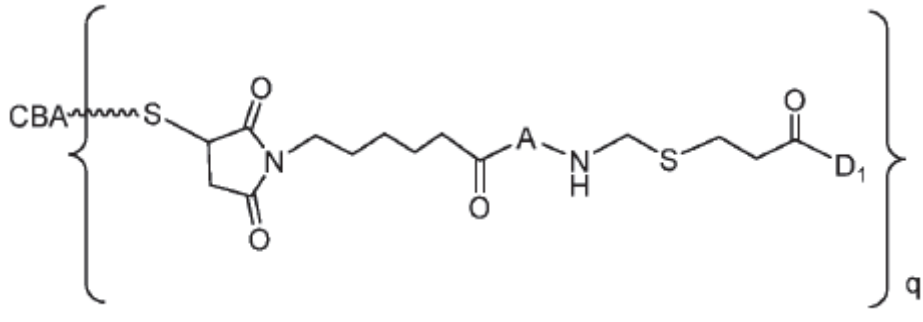

CBA
S
O
N
O
O
O
A
H
N
S
D1
O
q;

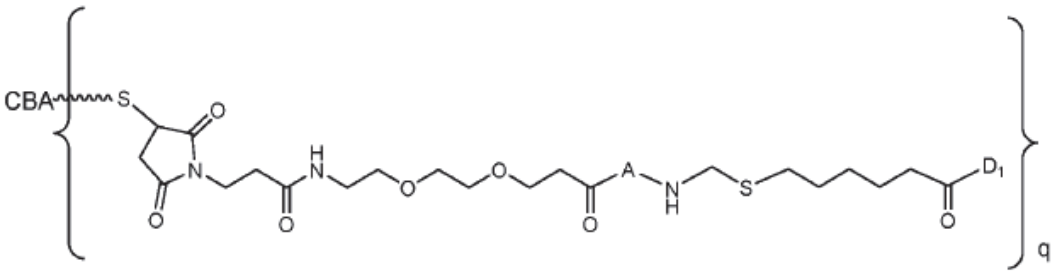

CBA
S
O
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;


CBA
S
O
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;

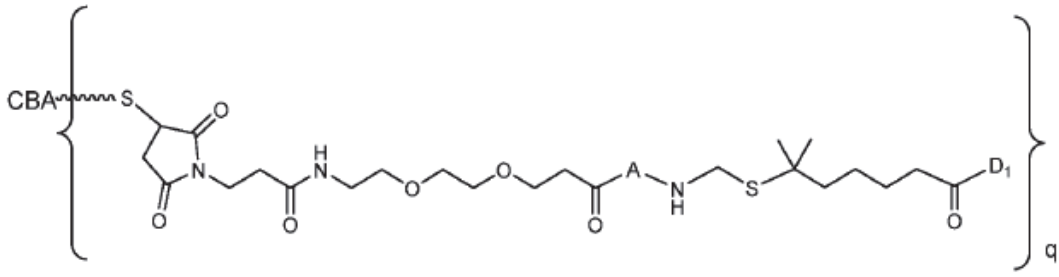

CBA
S
O
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;


CBA
S
O
N
O
O
A
N
H
S
D1
O
q;

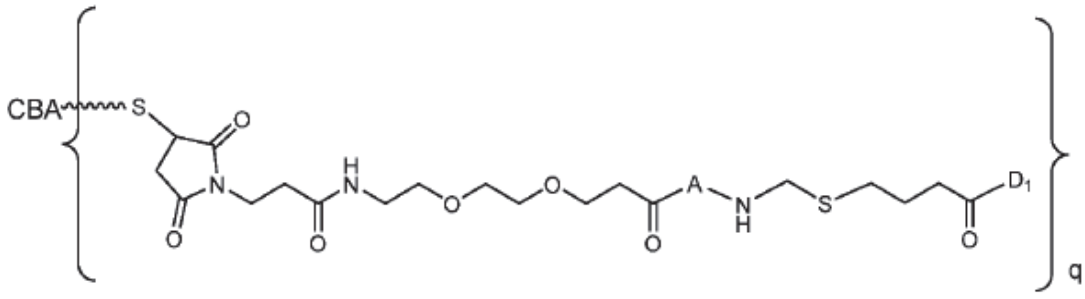




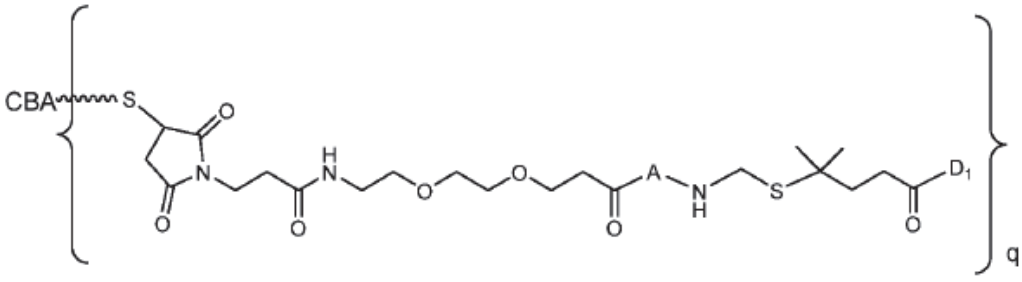
;



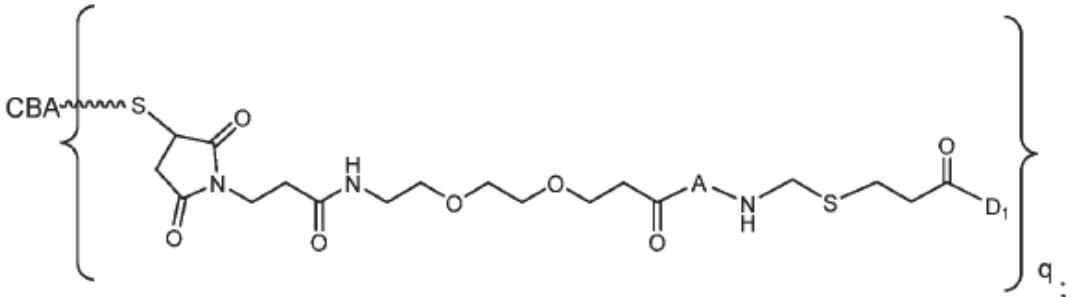
;



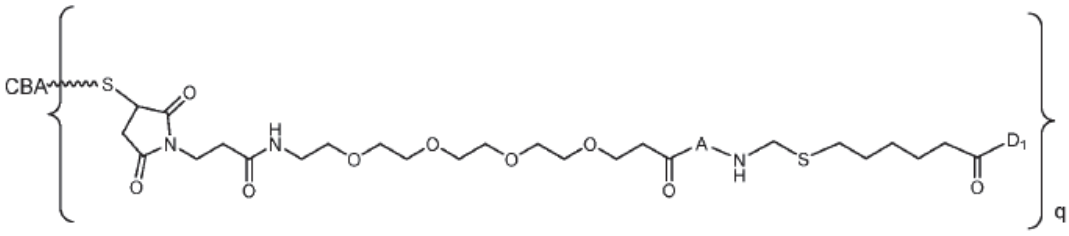
;



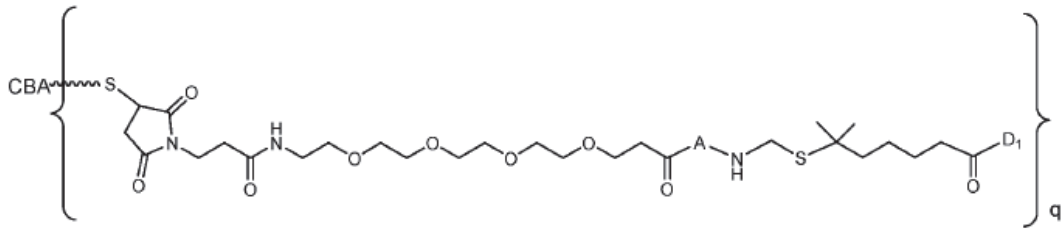
;



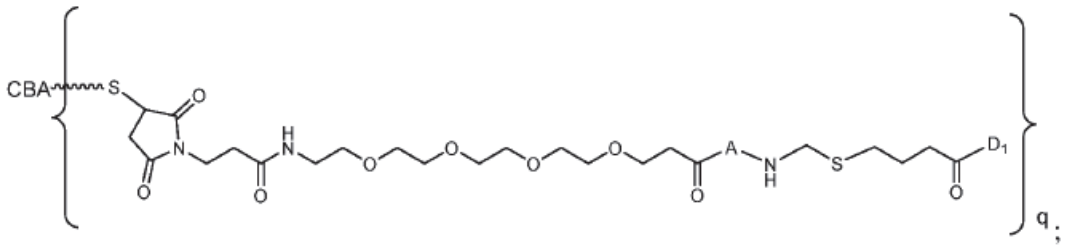
;

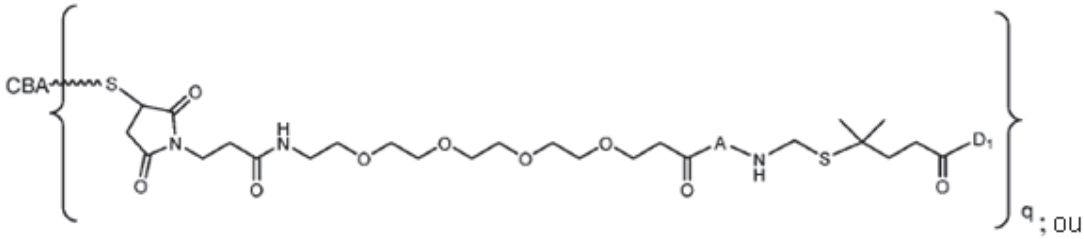


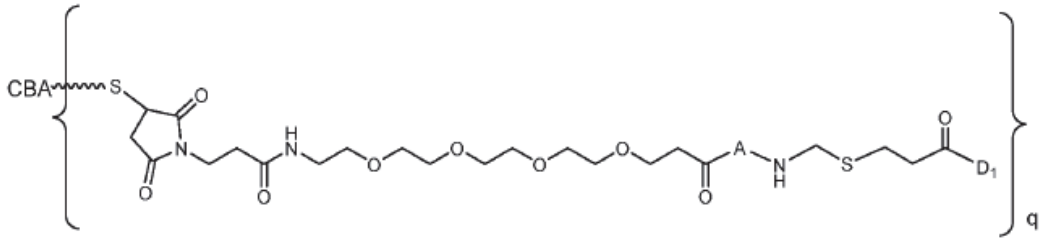
;



;



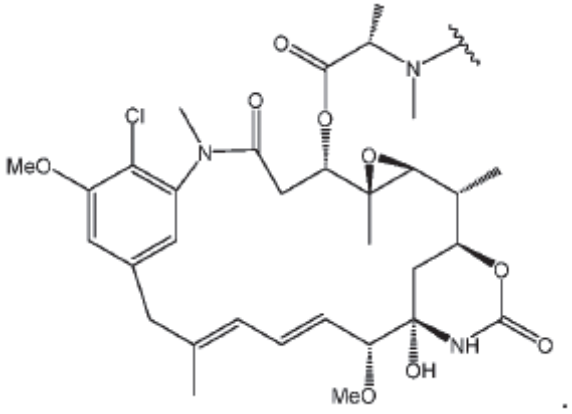




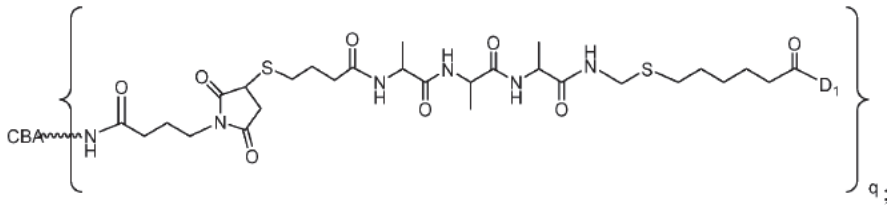
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

A é Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro ou D-Ala-tBu-Gly, e

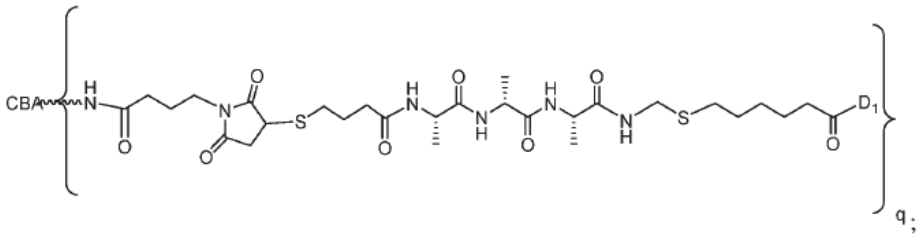
D_1 é representado pela seguinte fórmula:



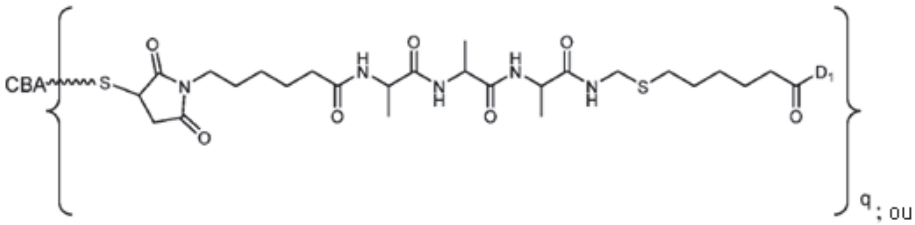
12. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:



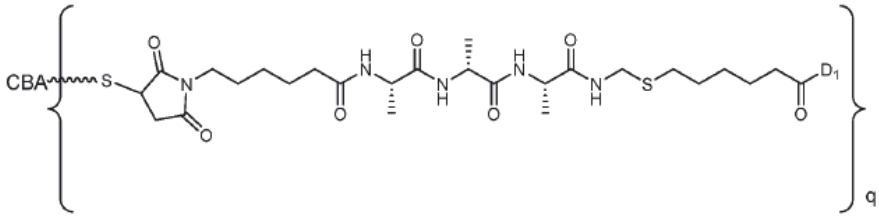
q;



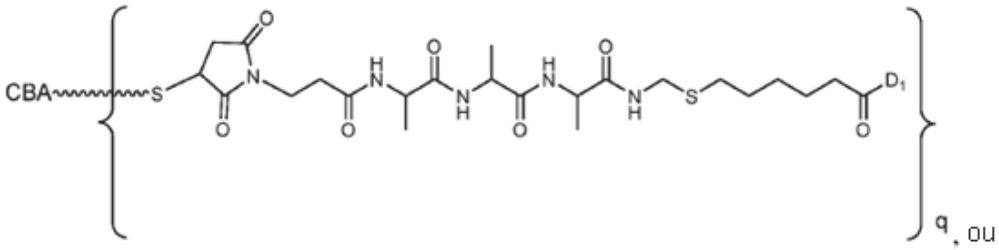
q;

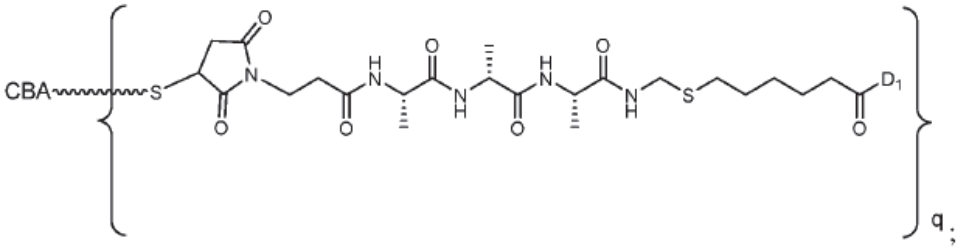


q; ou

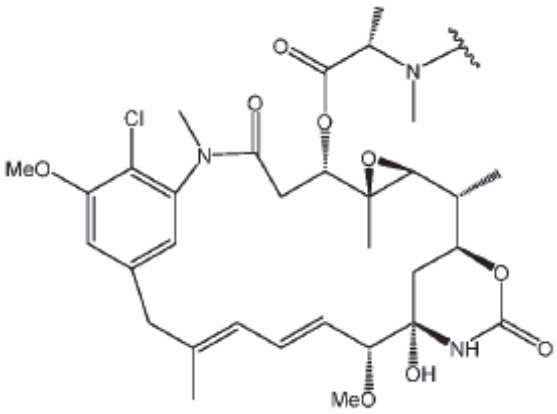


q,





em que D_1 é representado pela seguinte fórmula:



13. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que se liga especificamente a ADAM9 humana e cyno ADAM9 em que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo é conjugado com o agente farmacológico.

14. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2 e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, um domínio de CDR_L2 e um domínio de CDR_L3

que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 8, 35 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 8, 36 e 10 e SEQ ID NOs: 63, 13, 14, respectivamente; e

(d) SEQ ID NOs: 34, 36, e 10 e SEQ ID NO: 64, 13, 65, respectivamente.

15. Imunoconjugado, de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação um ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas a sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e

(d) SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

16. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO:56, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO:56, respectivamente; e

(d) SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

17. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 13, ca-

racterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo é otimizado para ter pelo menos uma intensificação de 100 vezes em afinidade de ligação com cyno ADAM9 e retém ligação de alta afinidade à ADAM9 humana em comparação com o anticorpo parental quimérico ou murino.

18. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio de CDR_H1, um domínio de CDR_H2 e um domínio de CDR_H3 e um domínio de CDR_L1, um domínio de CDR_L2 e um domínio de CDR_L3 que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 8, 35 e 37 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 8, 35 e 38 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 8, 35 e 39 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 8, 35 e 40 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(e) SEQ ID NOs: 8, 35 e 41 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs: 8, 35 e 42 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 8, 35 e 43 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(h) SEQ ID NOs: 8, 35 e 44 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente; e

(j) SEQ ID NOs: 8, 35 e 46 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, res-

pectivamente.

19. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação um ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm sequências que são pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idênticas a sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e

(j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

20. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(b) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(c) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(d) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(e) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(f) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(g) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(h) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:55, respectivamente;

(i) SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente; e

(j) SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

21. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 20, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado é um anticorpo de comprimento completo que compreende uma região Fc.

22. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO:50 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(b) SEQ ID NO:51 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e

(c) SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

23. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 22, caracterizado pelo fato de que a dita região Fc é uma região Fc variante que compreende:

(a) uma ou mais modificações de aminoácido que reduzem a afinidade da região Fc variante para um FcγR selecionado do grupo que consiste em: L234A, L235A, e L234A e L235A; e/ou

(b) uma modificação de aminoácido que introduz um resíduo de cisteína em S442, em que a dita numeração é aquela do índice EU, como em Kabat; e/ou

(c) uma ou mais substituições de aminoácido que estendem a meia-vida da região Fc variante para FcRn selecionado do grupo que consiste em: M252Y, S254T e T256E.

24. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem as sequências selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NO: 141 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(b) SEQ ID NO: 142 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(c) SEQ ID NO: 143 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(d) SEQ ID NO: 151 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

(e) SEQ ID NO: 152 e SEQ ID NO:68, respectivamente;

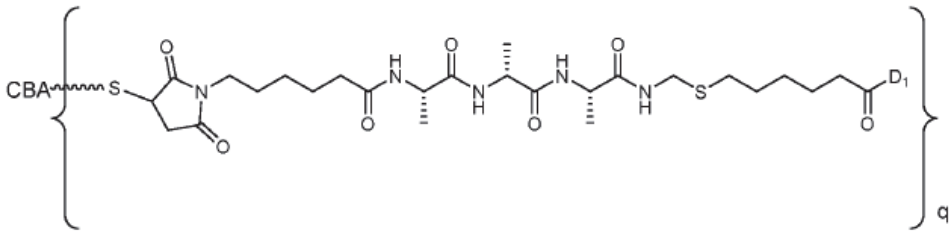
(f) SEQ ID NO: 153 e SEQ ID NO:68, respectivamente; e

(g) SEQ ID NO: 154 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

25. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 ou SEQ ID NO: 154 é lisina.

26. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 ou SEQ ID NO: 154 está ausente.

27. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:

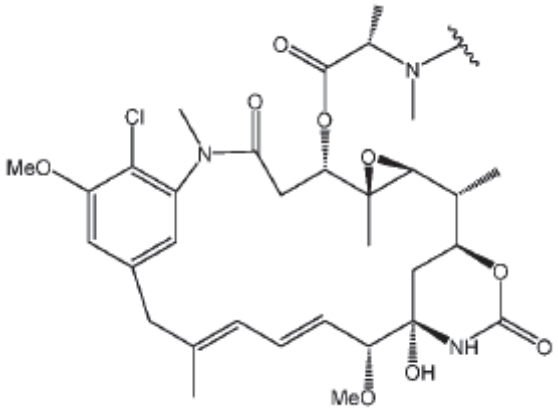


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2 e um domínio CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

q é 1 ou 2;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



28. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências de SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

29. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 142 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

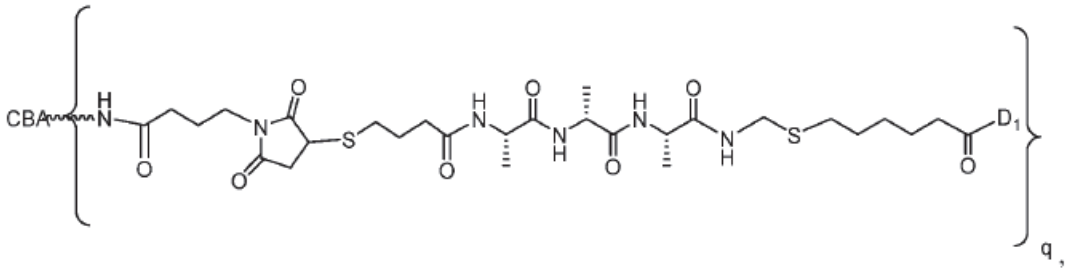
30. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 152 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

31. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO: 142 ou SEQ ID NO: 152 é lisina.

32. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO: 142 está ausente.

33. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 156 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

34. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o imunoconjugado é representado pela seguinte fórmula:

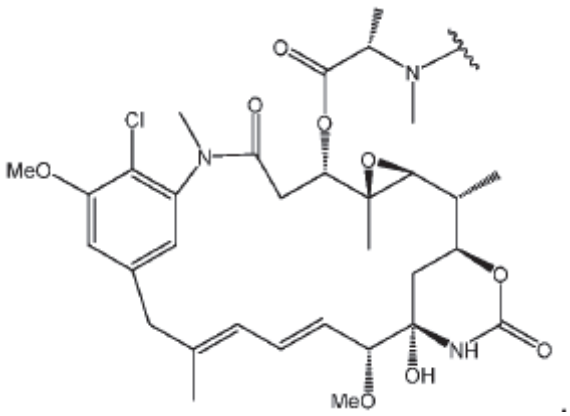


em que:

CBA é um anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo que compreende um domínio CDR_H1, um domínio CDR_H2 e um domínio CDR_H3 e um domínio CDR_L1, um domínio CDR_L2 e um domínio CDR_L3 que têm as sequências das SEQ ID NOs: 8, 35 e 45 e SEQ ID NOs: 62, 13, 14, respectivamente;

q é um número inteiro de 1 ou 10;

D_1 é representado pela seguinte fórmula:



35. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado ou fragmento de ligação a ADAM9 do mesmo compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL) que têm as sequências de SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

36. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 35, ca-

racterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

37. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 151 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

38. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO: 151 é lisina.

39. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que X na SEQ ID NO:52 está ausente.

40. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-ADAM9 humanizado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve que têm as sequências da SEQ ID NO: 155 e SEQ ID NO:68, respectivamente.

41. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz do imunoconjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 40, e um carreador, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

42. Método para tratar uma doença ou afecção associada a ou distinguida pela expressão de ADAM9 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz do imunoconjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 40, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 41.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a dita doença ou afecção associada ou distinguida pela expressão de ADAM9 é câncer.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, caracteriza-

do pelo fato de que o dito câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de pulmão de células não pequenas, câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer gástrico, câncer pancreático, carcinoma de células renais, câncer de próstata, câncer esofágico, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer uterino, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer cervical, câncer de tireoide, câncer testicular, câncer mieloide, melanoma e câncer linfoide.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o dito câncer de pulmão de células não pequenas é carcinoma de células escamosas, carcinoma de células não escamosas, adenocarcinoma, ou carcinoma não diferenciado de células grandes.

46. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o dito câncer colorretal é adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma colorretal primário, leiomiossarcoma ou carcinoma de células escamosas.

47. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o método é destinado a tratar câncer de pulmão de células não pequenas, câncer gástrico, câncer pancreático, câncer de mama triplo negativo (TNBC) ou câncer colorretal.

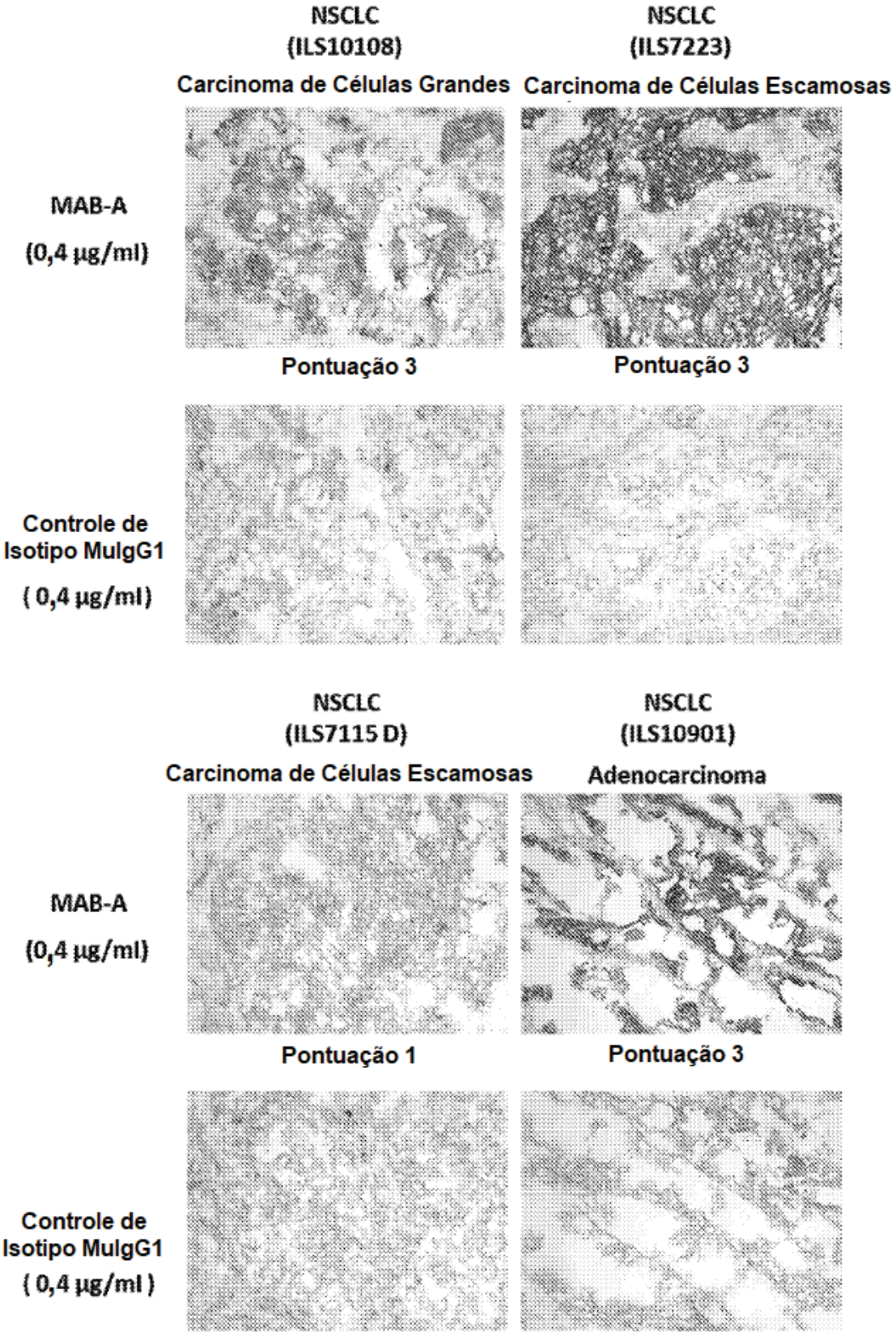

NSCLC
(ILS10108)
Carcinoma de Células Grandes
NSCLC
(ILS7223)
Carcinoma de Células Escamosas
MAB-A
(0,4 µg/ml)
Pontuação 3
Pontuação 3
Controle de
Isotipo MulgG1
(0,4 µg/ml)
NSCLC
(ILS7115 D)
Carcinoma de Células Escamosas
NSCLC
(ILS10901)
Adenocarcinoma
MAB-A
(0,4 µg/ml)
Pontuação 1
Pontuação 3
Controle de
Isotipo MulgG1
(0,4 µg/ml)

FIG. 1A

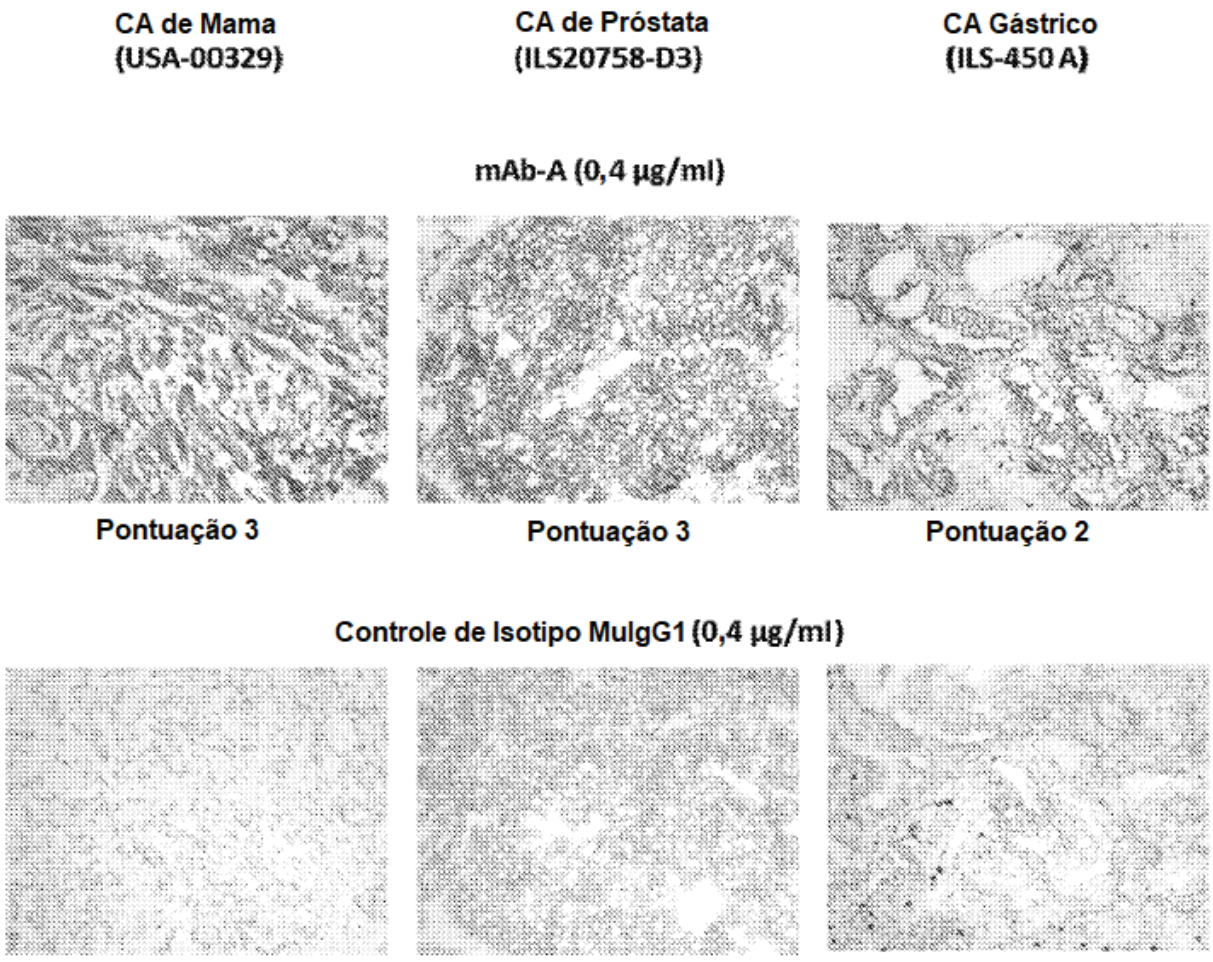

CA de Mama
(USA-00329)
CA de Próstata
(ILS20758-D3)
CA Gástrico
(ILS-450 A)
mAb-A (0,4 µg/ml)
Pontuação 3
Pontuação 3
Pontuação 2
Controle de Isotipo MulgG1 (0,4 µg/ml)

FIG. 1B

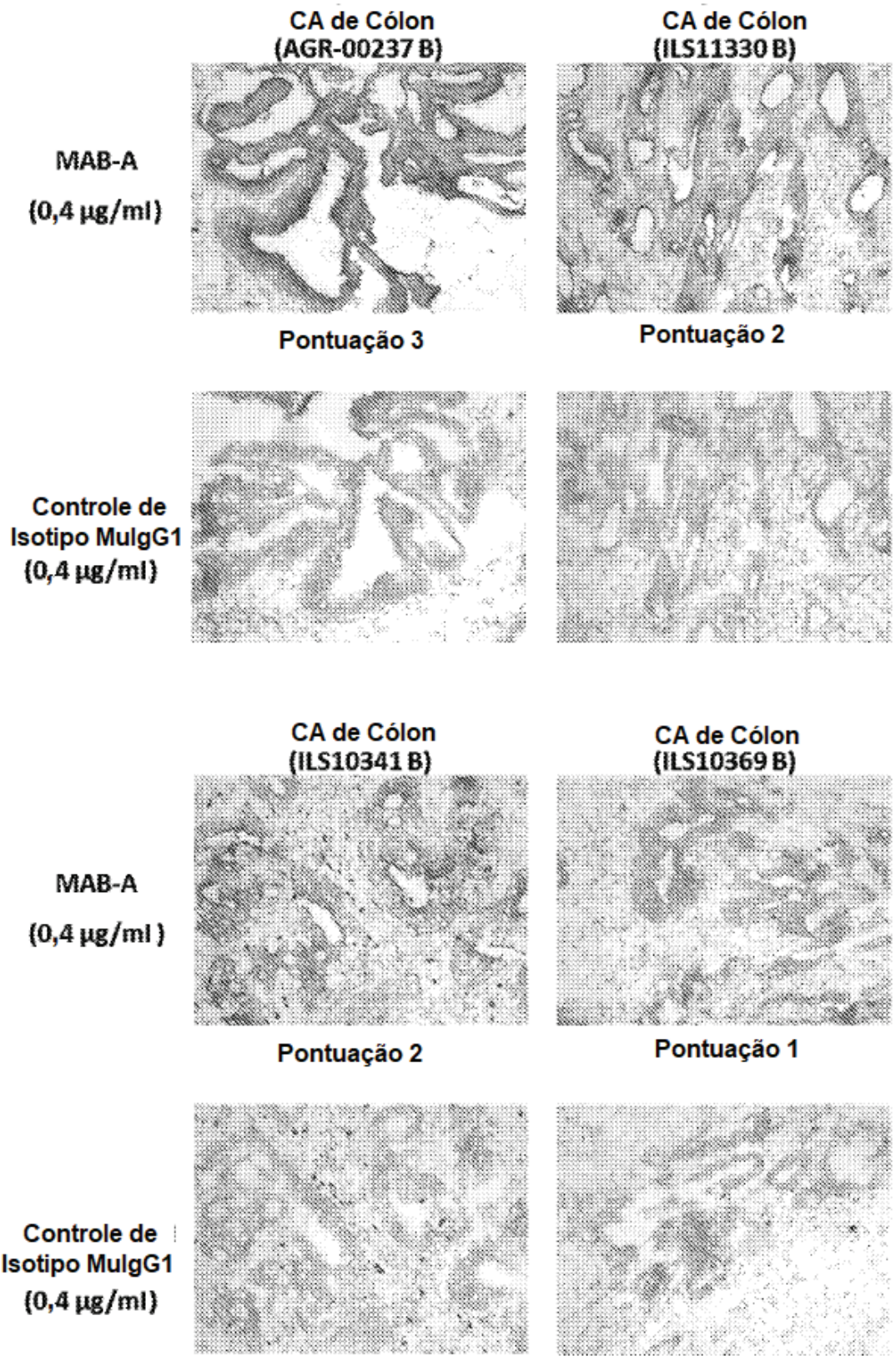

CA de Cólon
(AGR-00237 B)
CA de Cólon
(ILS11330 B)
MAB-A
(0,4 µg/ml)
Pontuação 3
Pontuação 2
Controle de
Isotipo MulgG1
(0,4 µg/ml)
CA de Cólon
(ILS10341 B)
CA de Cólon
(ILS10369 B)
MAB-A
(0,4 µg/ml)
Pontuação 2
Pontuação 1
Controle de
Isotipo MulgG1
(0,4 µg/ml)

FIG. 1C

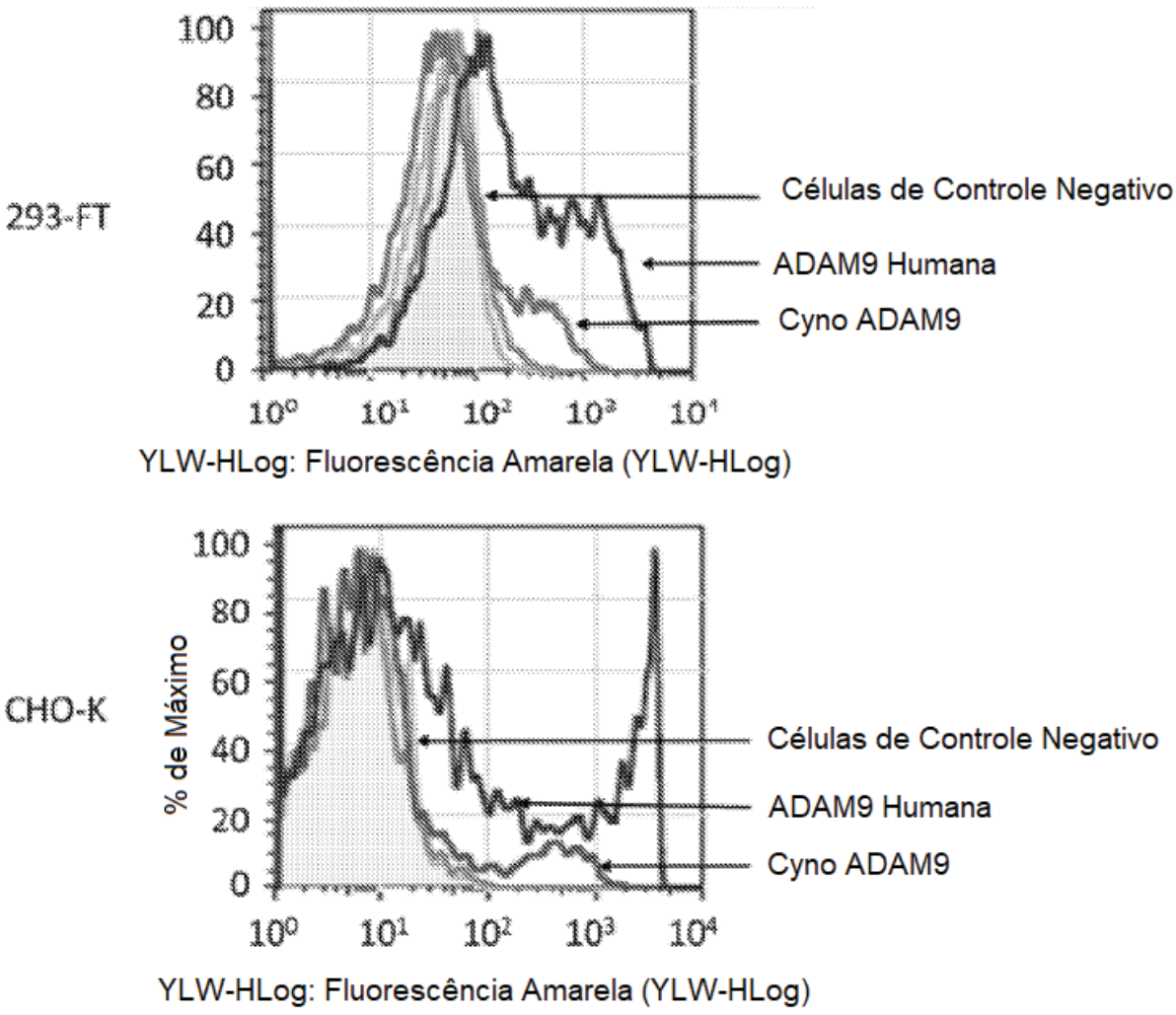

293-FT
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
Células de Controle Negativo
ADAM9 Humana
Cyno ADAM9
YLW-HLog: Fluorescência Amarela (YLW-HLog)
CHO-K
% de Máximo
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
Células de Controle Negativo
ADAM9 Humana
Cyno ADAM9
YLW-HLog: Fluorescência Amarela (YLW-HLog)

FIG. 2

		FR1	CDR1
MAB-A VH murino	SEQ ID NO:7	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMH
hMAB-A VH(1)	SEQ ID NO:16	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(2)	SEQ ID NO:17	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(3)	SEQ ID NO:18	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(4)	SEQ ID NO:19	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	...I.
hMAB-A VH(2B)	SEQ ID NO:21	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(2C)	SEQ ID NO:22	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(2D)	SEQ ID NO:23	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....
hMAB-A VH(2I)	SEQ ID NO:28	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	.....

FR2	CDR2	FR3
WVKQRPGQGLEWIG	EIIPINGHTNYNEKFKS	KATLTLDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAR
..R.A..K....V.	.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.......R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.......R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....

CDR3	FR4
GGYYYYGSRDYFDY	WGQGTTLTVSS
.....	......V....
.....	......V....
.....	......V....
.....	......V....
......IGKGVL..	......V....
......PRFGWL..	......V....
......TGKGVL..	......V....
......PRQGFL..	......V....

FIG. 3A

		FR1	CDR1
MAB-A VL murino	**SEQ ID NO:11**	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	KASQSVDYDGDSYMN
hMAB-A VL(1)	**SEQ ID NO:54**	...M....D.......E.....	.....
hMAB-A VL(2)	**SEQ ID NO:55**	...M....D.......E.....	.....S.....
hMAB-A VL(3)	**SEQ ID NO:56**	...M....D.......E.....	R.....S.....
hMAB-A VL(4)	**SEQ ID NO:57**	...M....D.......E.....	R.....S....L.

FR2	CDR2	FR3	CDR3
WYQQIPGQPPKLLIY	AASDLES	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	QQSHEDPFT
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	...YST...

FR4
FGGGTKLEIK
.....
.....
.....
.....

FIG. 3B

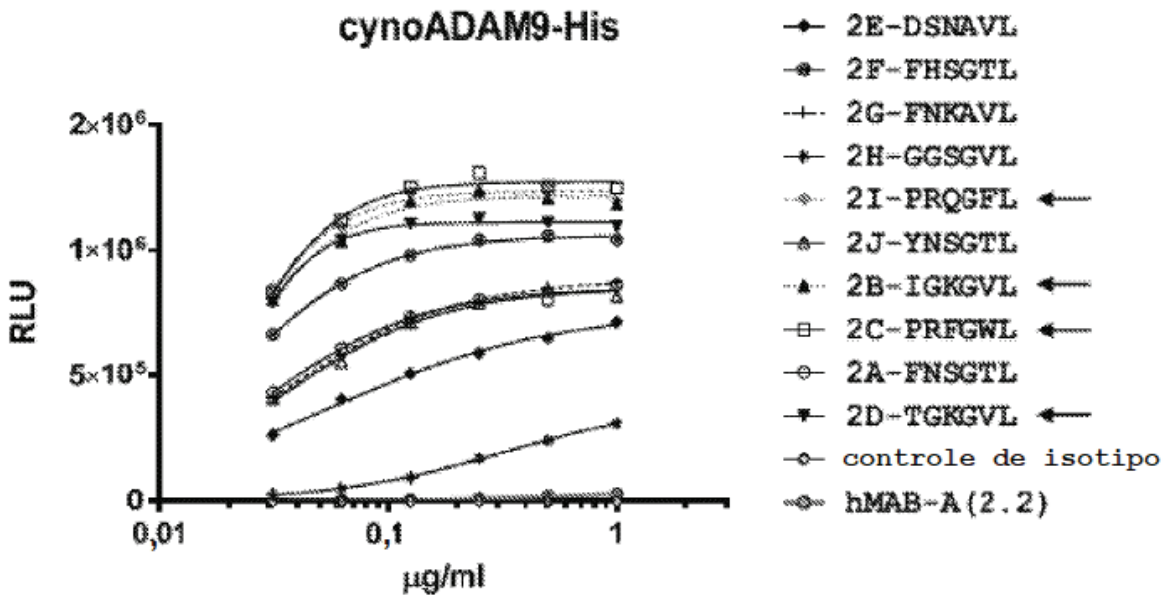

cynoADAM9-His
RLU
2×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
0,01
0,1
1
µg/ml
2E-DSNAVL
2F-FHSGTL
2G-FNKAVL
2H-GGSGVL
2I-PRQGFL
2J-YNSGTL
2B-IGKGVL
2C-PRFGWL
2A-FNSGTL
2D-TGKGVL
controle de isotipo
hMAB-A(2.2)

FIG. 4A

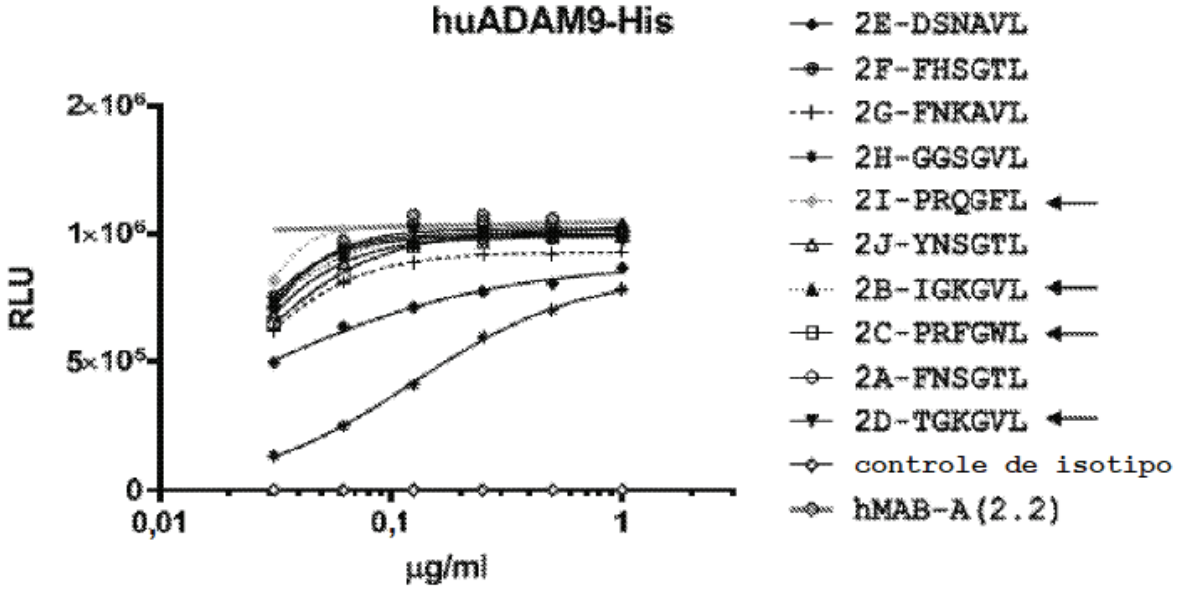

huADAM9-His
RLU
2×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
0,01
0,1
1
µg/ml
2E-DSNAVL
2F-FHSGTL
2G-FNKAVL
2H-GGSGVL
2I-PRQGFL
2J-YNSGTL
2B-IGKGVL
2C-PRFGWL
2A-FNSGTL
2D-TGKGVL
controle de isotipo
hMAB-A(2.2)

FIG. 4B

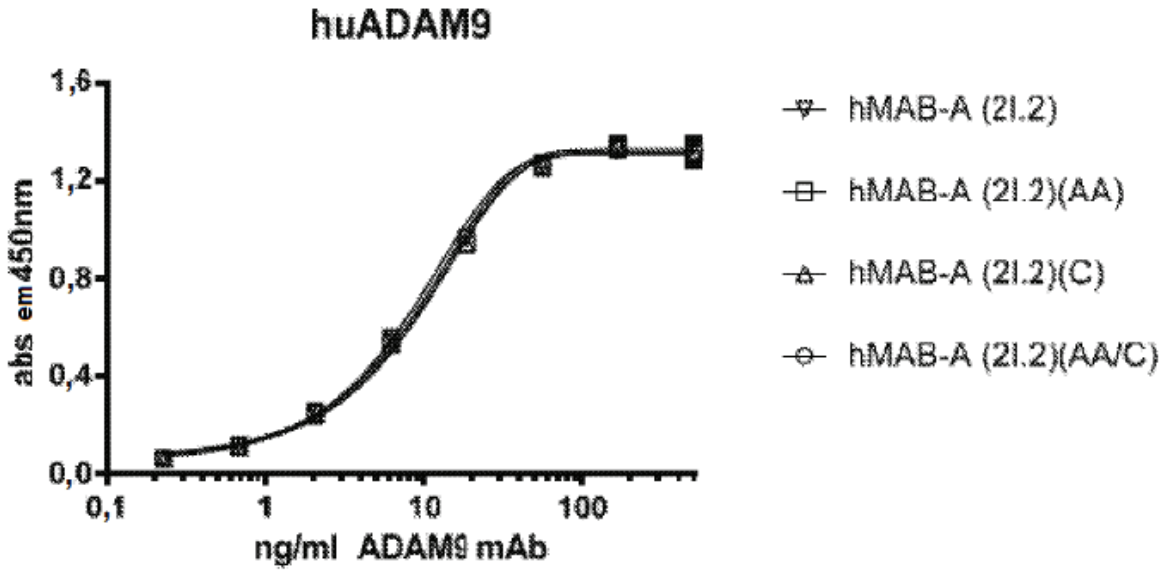

huADAM9
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
abs em450nm
0,1
1
10
100
ng/ml ADAM9 mAb
hMAB-A (2I.2)
hMAB-A (2I.2)(AA)
hMAB-A (2I.2)(C)
hMAB-A (2I.2)(AA/C)

FIG. 5A

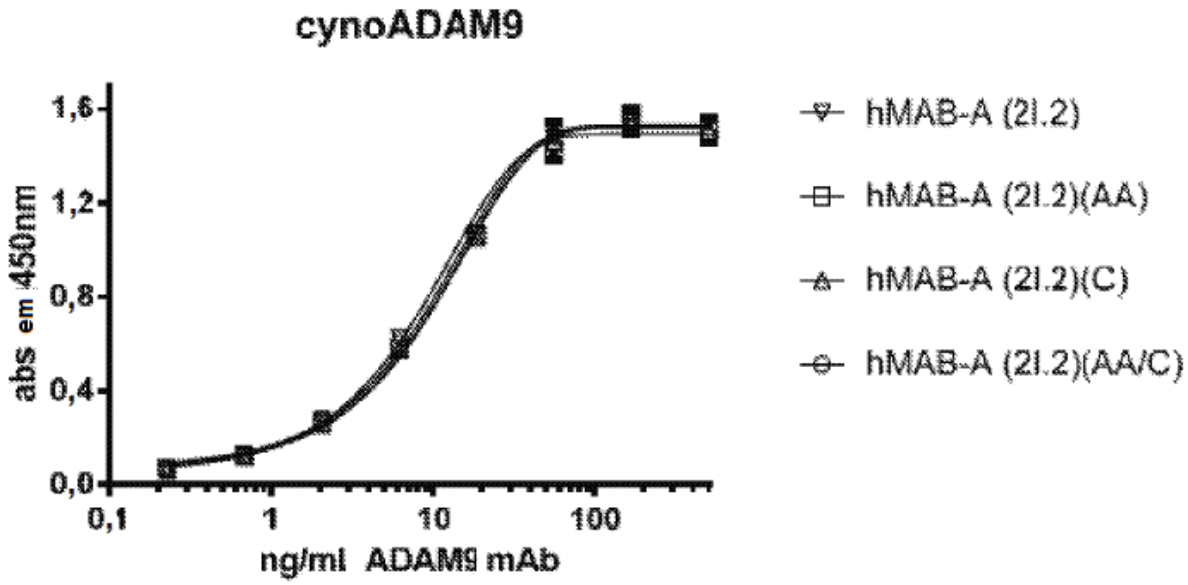

cynoADAM9
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
abs em 450nm
0,1
1
10
100
ng/ml ADAM9 mAb
hMAB-A (2I.2)
hMAB-A (2I.2)(AA)
hMAB-A (2I.2)(C)
hMAB-A (2I.2)(AA/C)

FIG. 5B

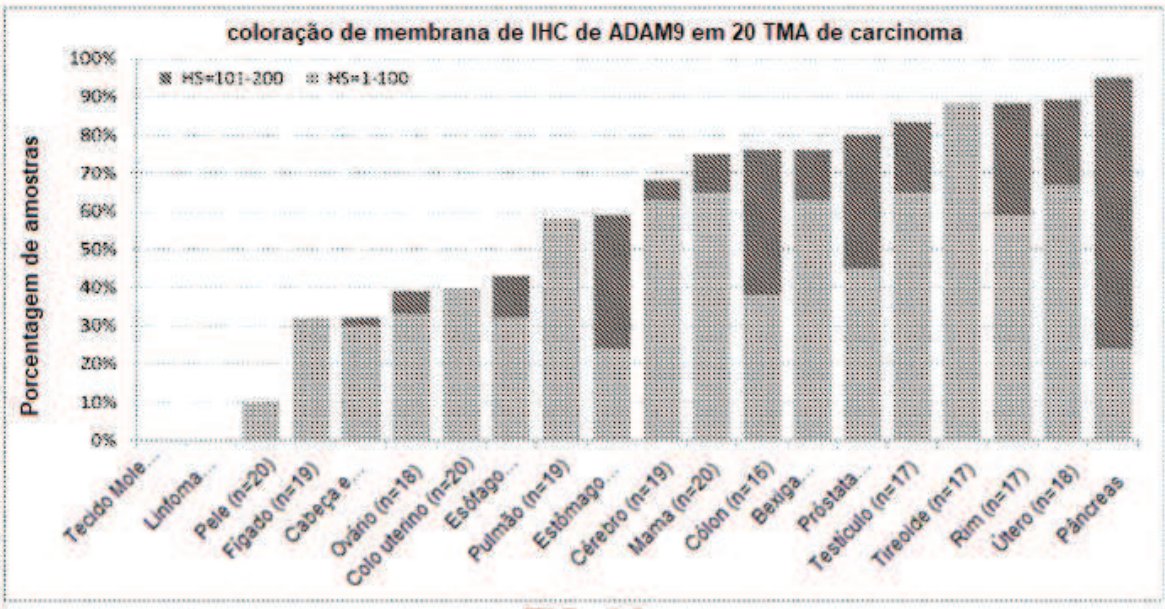

coloração de membrana de IHC de ADAM9 em 20 TMA de carcinoma
HS=101-200
HS=1-100
Porcentagem de amostras
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Tecido Mole...
Linfoma...
Pele (n=20)
Fígado (n=19)
Cabeça e...
Ovário (n=18)
Colo uterino (n=20)
Esôfago...
Pulmão (n=19)
Estômago...
Cérebro (n=19)
Mama (n=20)
Cólon (n=16)
Bexiga...
Próstata...
Testículo (n=17)
Tireoide (n=17)
Rim (n=17)
Útero (n=18)
Pâncreas

FIG. 6A

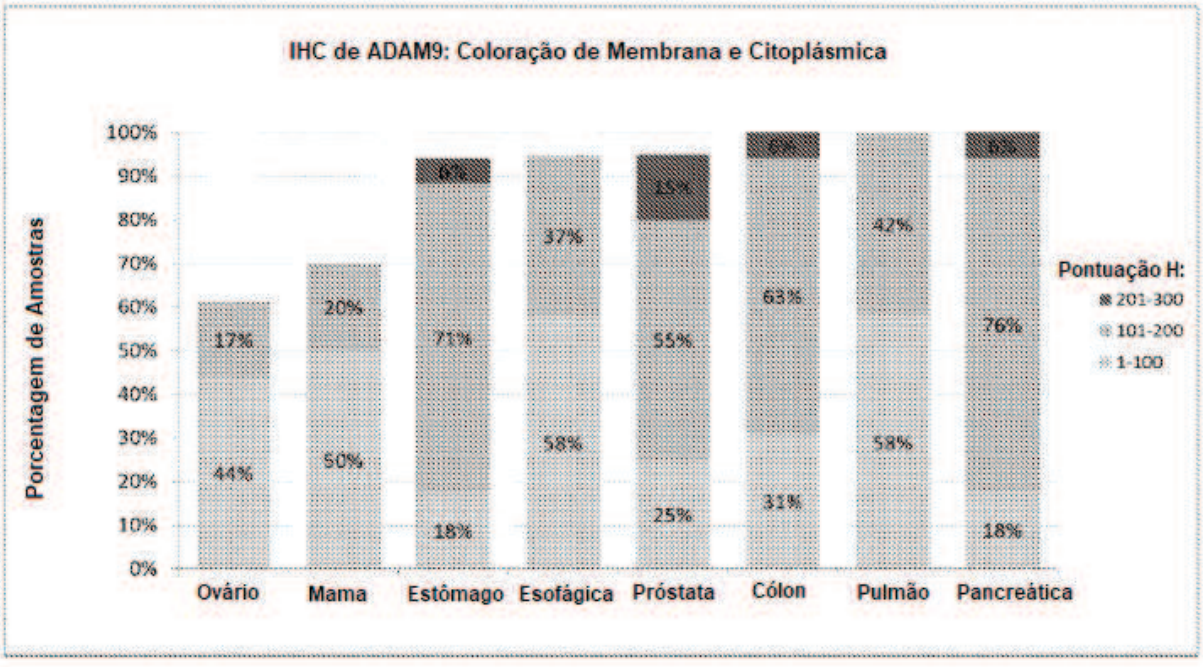

IHC de ADAM9: Coloração de Membrana e Citoplásmica
Porcentagem de Amostras
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
17%
44%
20%
50%
6%
71%
18%
37%
58%
15%
55%
25%
6%
63%
31%
42%
58%
6%
76%
18%
Ovário
Mama
Estômago
Esofágica
Próstata
Cólon
Pulmão
Pancreática
Pontuação H:
201-300
101-200
1-100

FIG. 6B

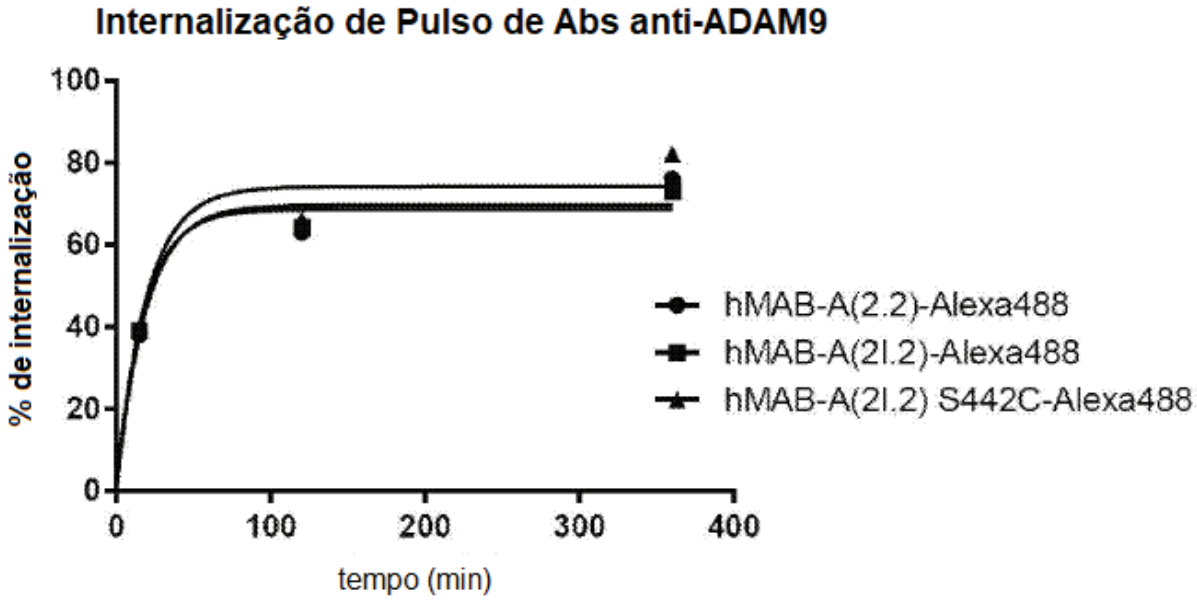

Internalização de Pulso de Abs anti-ADAM9
% de internalização
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
tempo (min)
hMAB-A(2.2)-Alexa488
hMAB-A(2l.2)-Alexa488
hMAB-A(2l.2) S442C-Alexa488

FIG. 7A

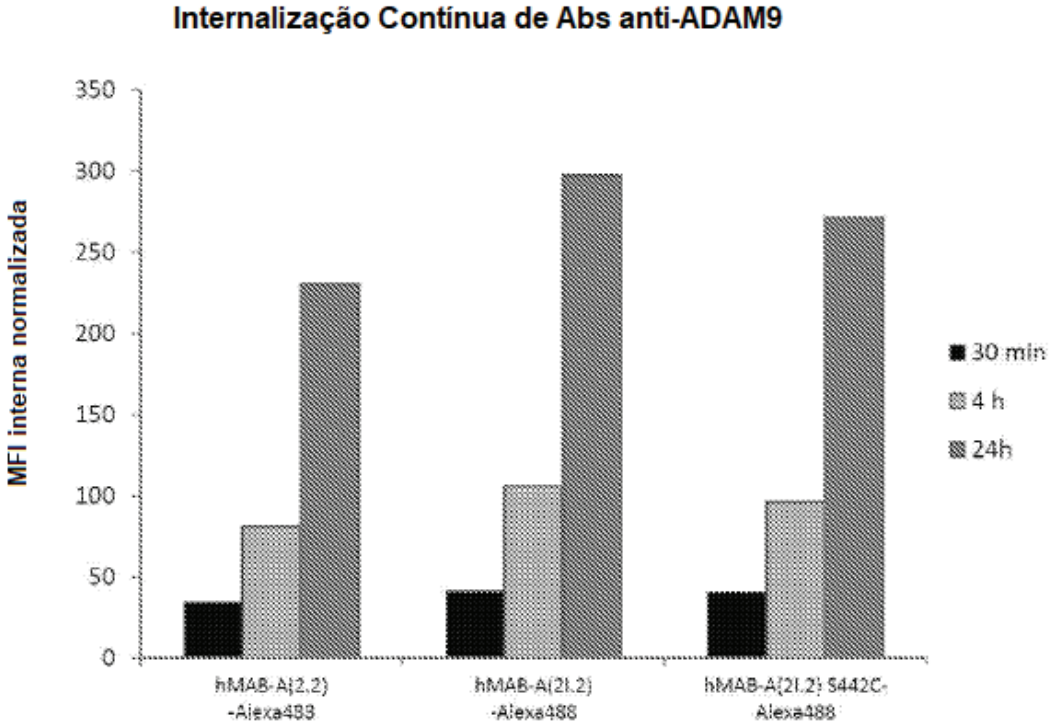

Internalização Contínua de Abs anti-ADAM9
MFI interna normalizada
350
300
250
200
150
100
50
0
hMAB-A(2.2)
-Alexa488
hMAB-A(2l.2)
-Alexa488
hMAB-A(2l.2) S442C-
Alexa488
30 min
4 h
24h

FIG. 7B

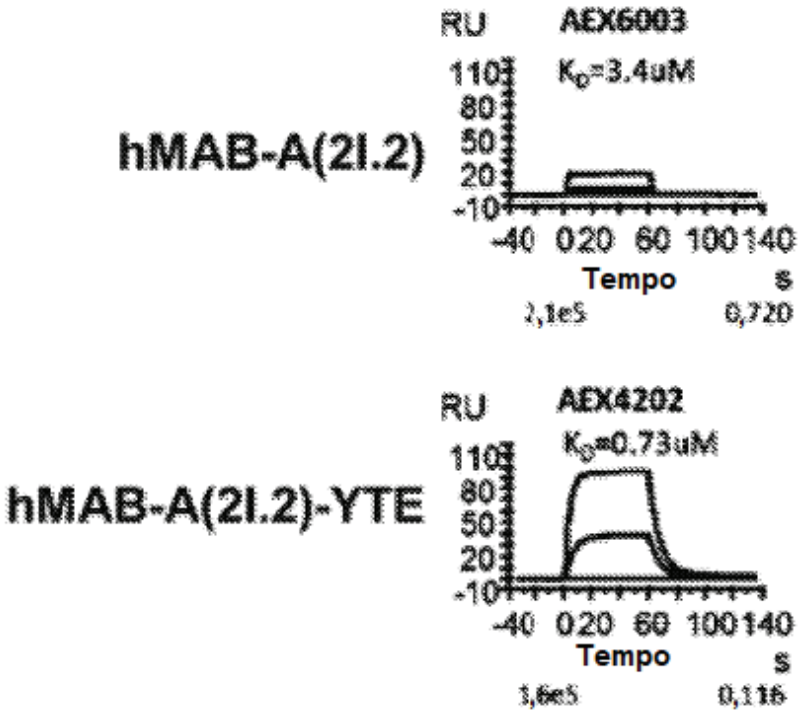

hMAB-A(2I.2)
RU
AEX6003
K_D=3.4uM
110
80
50
20
-10
-40 020 60 100140
Tempo
s
2,1e5
0,720
hMAB-A(2I.2)-YTE
RU
AEX4202
K_D=0.73uM
110
80
50
20
-10
-40 020 60 100140
Tempo
s
3,6e5
0,116

FIG. 8A

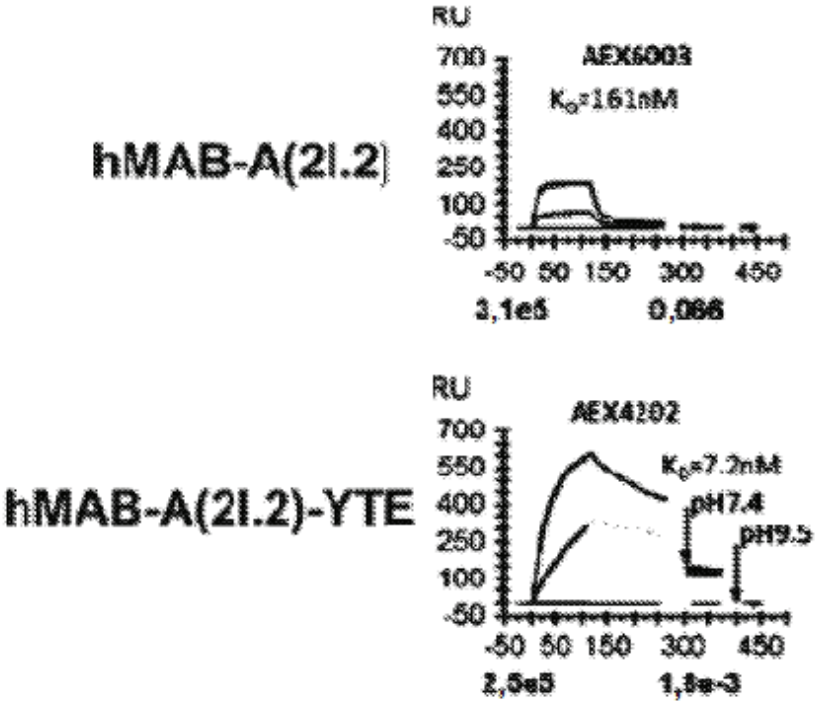

hMAB-A(2I.2)
RU
AEX6003
K_D=161nM
700
550
400
250
100
-50
-50 50 150 300 450
3,1e5
0,066
hMAB-A(2I.2)-YTE
RU
AEX4202
K_D=7.2nM
pH7.4
pH9.5
700
550
400
250
100
-50
-50 50 150 300 450
2,5e5
1,8e-3

FIG. 8B

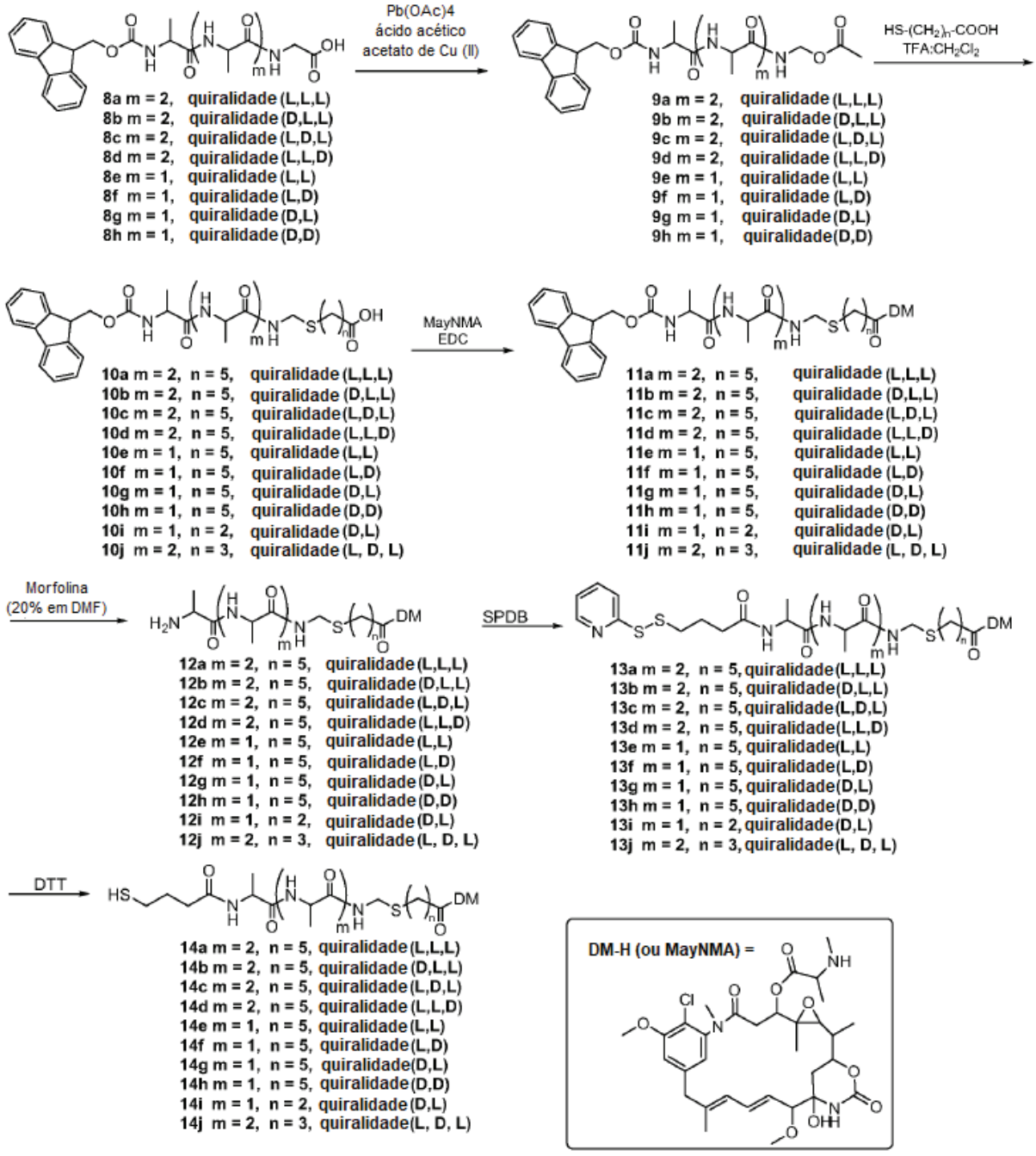

Pb(OAc)4
ácido acético
acetato de Cu (II)
HS-(CH2)n-COOH
TFA:CH2Cl2
8a m = 2, quiralidade (L,L,L)
8b m = 2, quiralidade (D,L,L)
8c m = 2, quiralidade (L,D,L)
8d m = 2, quiralidade (L,L,D)
8e m = 1, quiralidade (L,L)
8f m = 1, quiralidade (L,D)
8g m = 1, quiralidade (D,L)
8h m = 1, quiralidade (D,D)
9a m = 2, quiralidade (L,L,L)
9b m = 2, quiralidade (D,L,L)
9c m = 2, quiralidade (L,D,L)
9d m = 2, quiralidade (L,L,D)
9e m = 1, quiralidade (L,L)
9f m = 1, quiralidade (L,D)
9g m = 1, quiralidade (D,L)
9h m = 1, quiralidade (D,D)
MayNMA
EDC
10a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
10b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
10c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
10d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
10e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
10f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
10g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
10h m = 1, n = 5, quiralidade (D,D)
10i m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
10j m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
11a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
11b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
11c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
11d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
11e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
11f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
11g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
11h m = 1, n = 5, quiralidade (D,D)
11i m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
11j m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
Morfolina
(20% em DMF)
SPDB
12a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
12b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
12c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
12d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
12e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
12f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
12g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
12h m = 1, n = 5, quiralidade (D,D)
12i m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
12j m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
13a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
13b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
13c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
13d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
13e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
13f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
13g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
13h m = 1, n = 5, quiralidade (D,D)
13i m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
13j m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
DTT
14a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
14b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
14c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
14d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
14e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
14f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
14g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
14h m = 1, n = 5, quiralidade (D,D)
14i m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
14j m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
DM-H (ou MayNMA) =

FIG. 9A

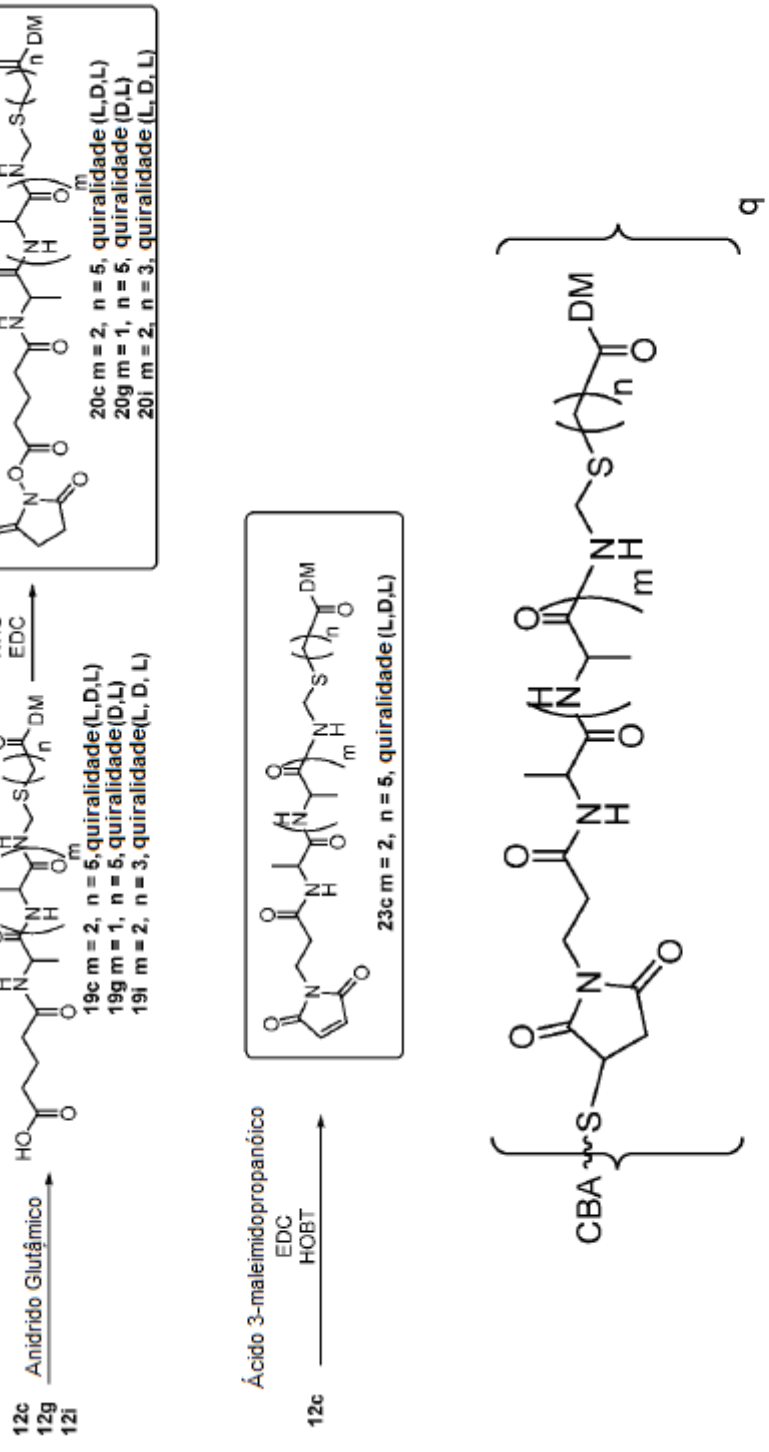
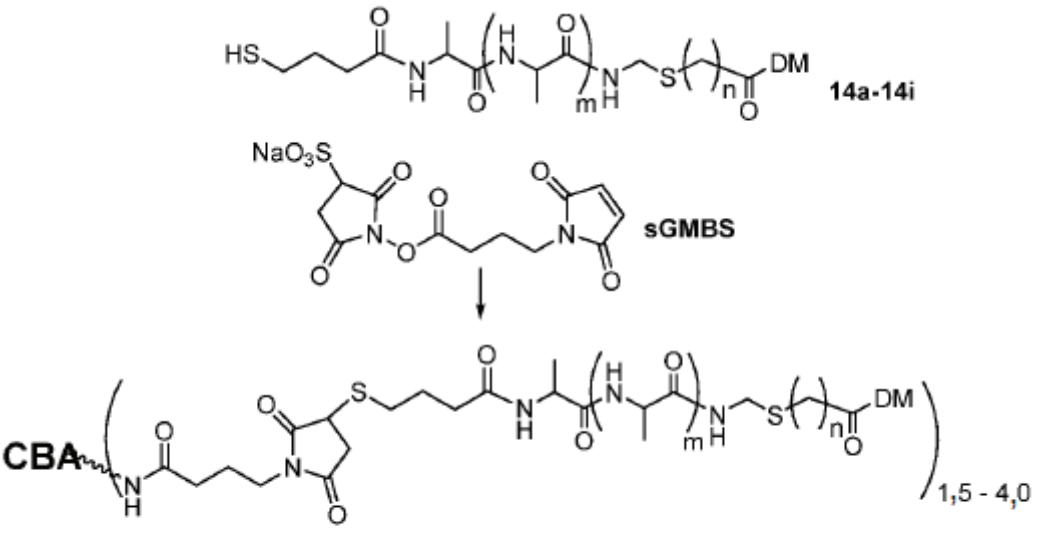

12c
12g
12i
Anidrido Glutâmico
19c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
19g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
19i m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
NHS
EDC
20c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
20g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
20i m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)
12c
Ácido 3-maleimidopropanóico
EDC
HOBT
23c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
CBA
25c CBA = anti-ADAM9 Ab, m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)

FIG. 9B



24a m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,L)
24b m = 2, n = 5, quiralidade (D,L,L)
24c m = 2, n = 5, quiralidade (L,D,L)
24d m = 2, n = 5, quiralidade (L,L,D)
24e m = 1, n = 5, quiralidade (L,L)
24f m = 1, n = 5, quiralidade (L,D)
24g m = 1, n = 5, quiralidade (D,L)
24h m = 1, n = 2, quiralidade (D,L)
24i m = 2, n = 3, quiralidade (L, D, L)

CBA = anticorpo anti-ADAM9

FIG. 9C

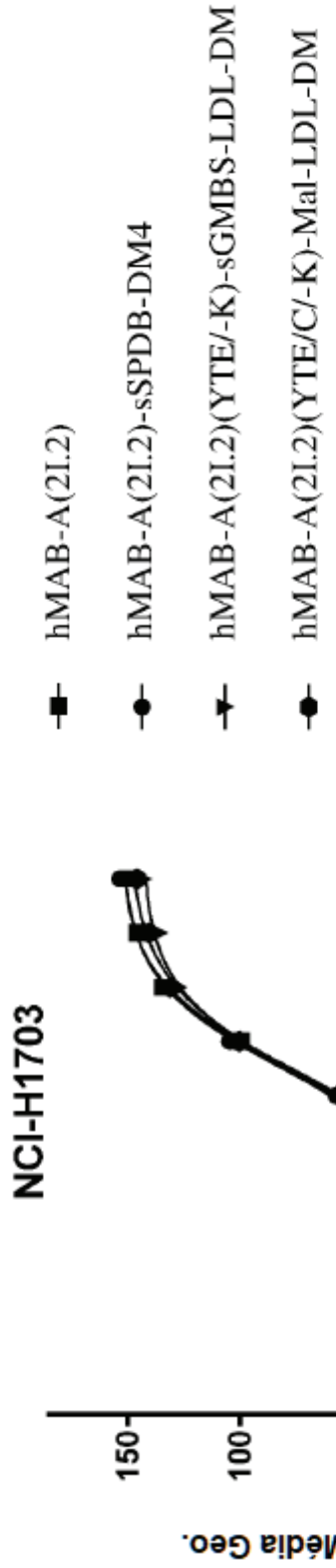

NCI-H1703
hMAB-A(2I.2)
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4
hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM
Média Geo.
150
100
50
0
-12
-10
-8
log de concentração de Ab (M)

FIG. 10

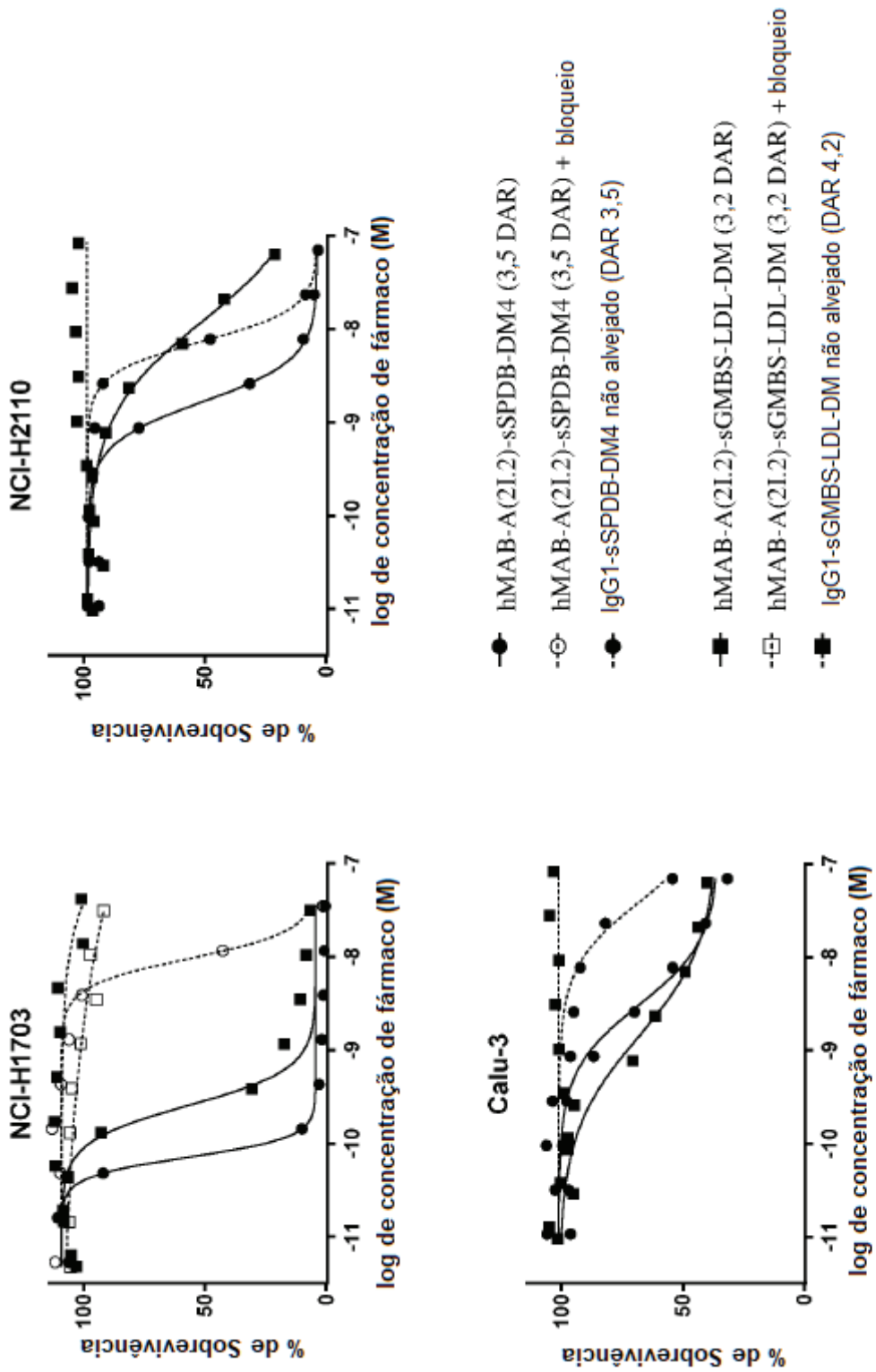

NCI-H2110
NCI-H1703
Calu-3
% de Sobrevivência
log de concentração de fármaco (M)
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3,5 DAR)
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3,5 DAR) + bloqueio
IgG1-sSPDB-DM4 não alvejado (DAR 3,5)
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3,2 DAR)
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3,2 DAR) + bloqueio
IgG1-sGMBS-LDL-DM não alvejado (DAR 4,2)

FIG. 11A

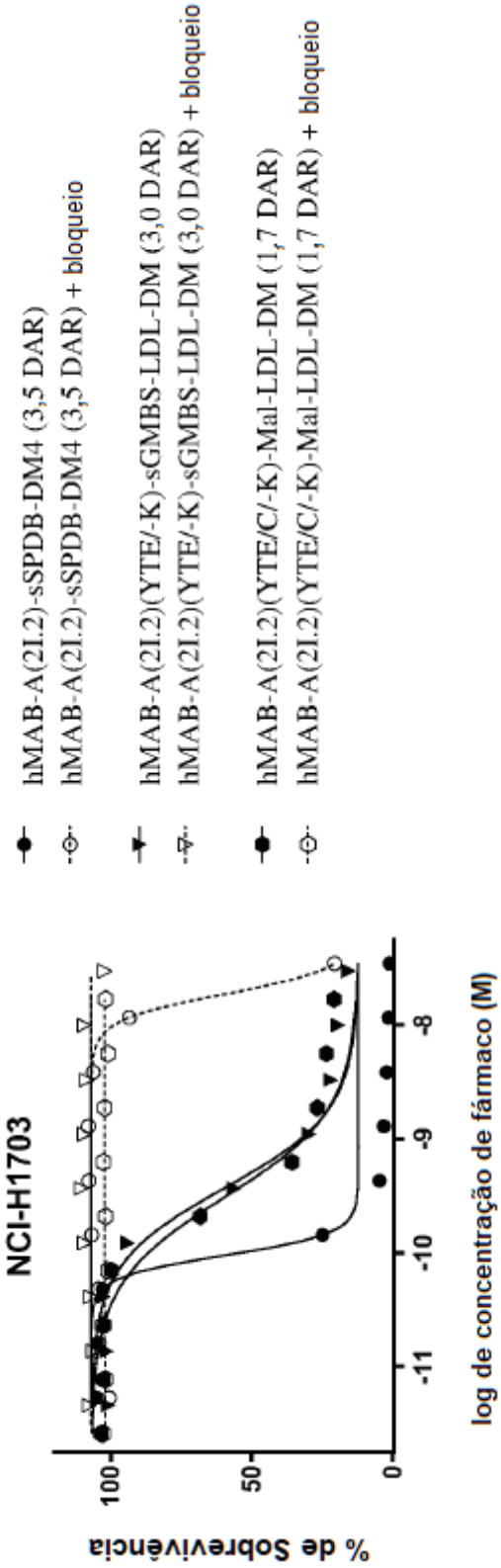
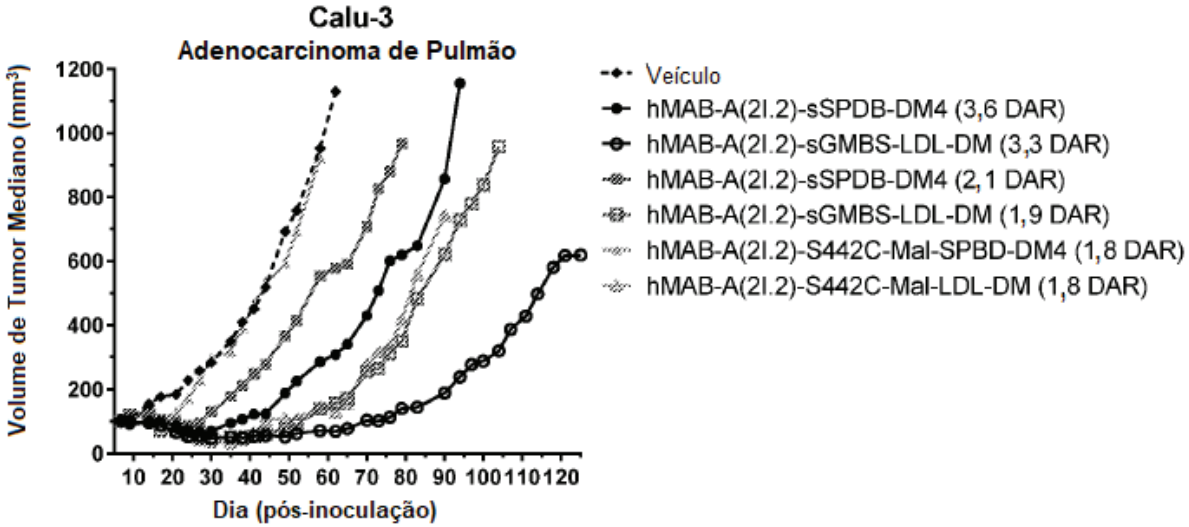

NCI-H1703
% de Sobrevivência
100
50
0
-11
-10
-9
-8
log de concentração de fármaco (M)
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3,5 DAR)
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3,5 DAR) + bloqueio
hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM (3,0 DAR)
hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM (3,0 DAR) + bloqueio
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,7 DAR)
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,7 DAR) + bloqueio

FIG. 11B

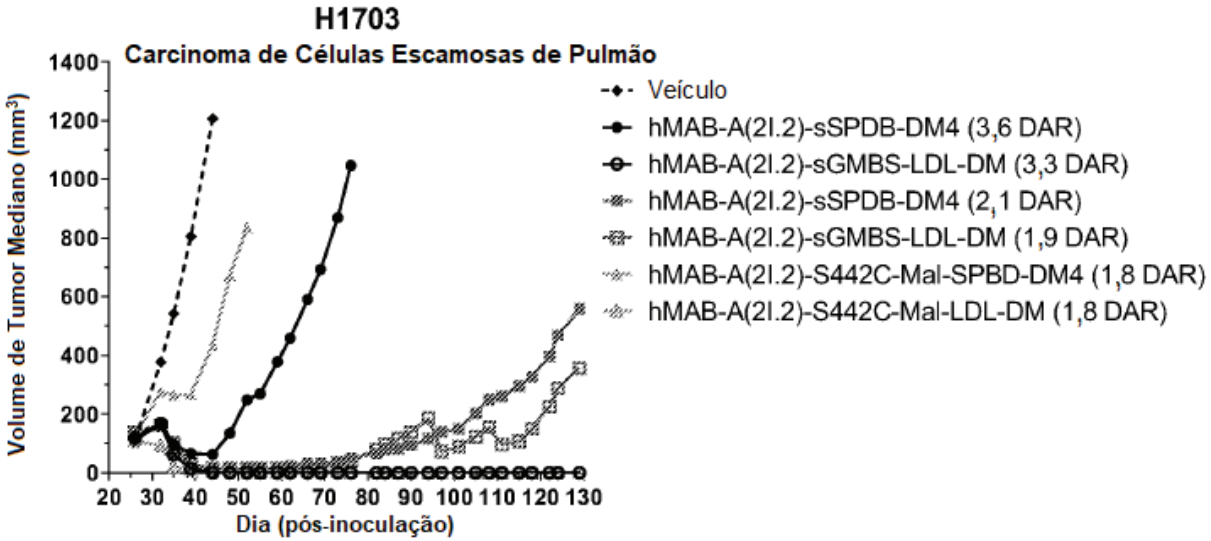
Petição 870210039447, de 30/04/2021, pág. 252/304



Tratamento (DM 50 µg/kg no dia 7)	% de T/C (Dia 58)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3,6 DAR)	30%	Ativo	34	6.7	++++	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3,3 DAR)	7%	Altamente Ativo	>66	>13,0	++++	6/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (2,1 DAR)	58%	Inativo	20	4,0	++++	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1,9 DAR)	15%	Ativo	47	9,2	++++	6/8	1/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1,8 DAR)	97%	Inativo	3	0,6	-	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1,8 DAR)	15%	Ativo	39	7,7	++++	6/8	2/8	0/8

FIG. 12

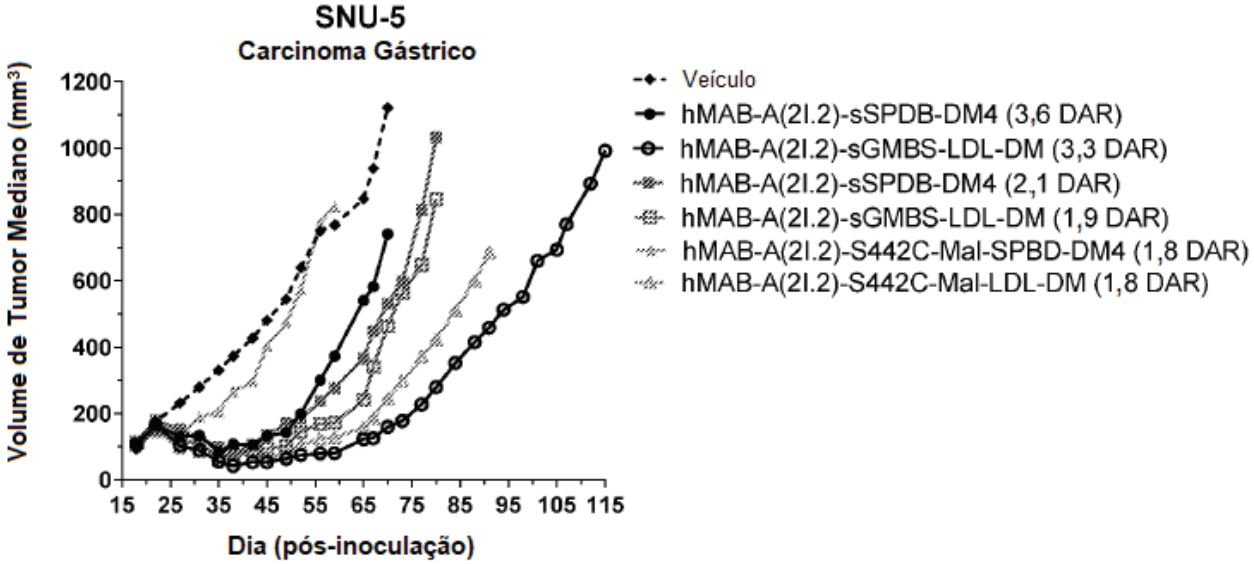
Petição 870210039447, de 30/04/2021, pág. 29/35



Tratamento (DM 50 µg/kg no dia 7)	% de T/C (Dia 44)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	5%	Altamente Ativo	32	1,3	++	3/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	0%	Altamente Ativo	>85	>3,4	++++	6/6	6/6	5/6
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	1%	Altamente Ativo	>66	>2,6	+++	6/6	5/6	2/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	1%	Altamente Ativo	64	2,5	+++	6/6	5/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	36%	Ativo	13	0,5	-	1/6	0/6	0/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	1%	Altamente Ativo	38	1.5	++	6/6	5/6	4/6

FIG. 13

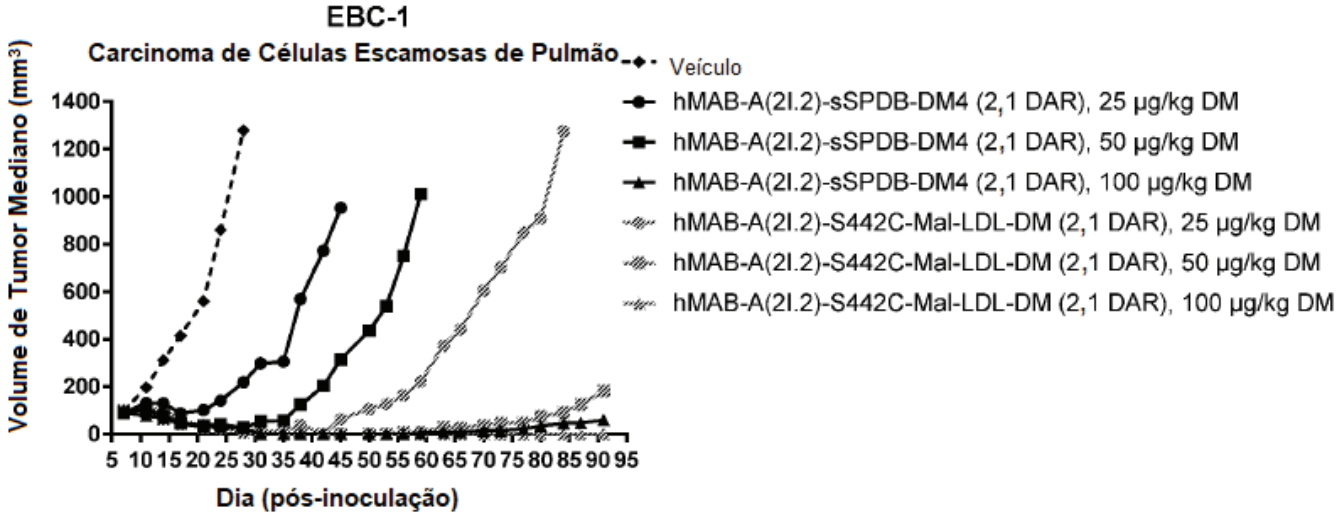
Petição 870210033947, de 30/04/2021, pág. 25/43



Tratamento (DM 50 µg/kg no dia 7)	% de T/C (Dia 70)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	66%	Inativo	0	0,0	-	2/6	0/6	0/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	14%	Ativo	45	0,7	+	4/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	47%	Inativo	10	0,2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	41%	Ativo	10	0,2	-	2/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	107%	Inativo	-11	-0,2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	22%	Ativo	28	0,4	-	2/6	1/6	1/6

FIG. 14

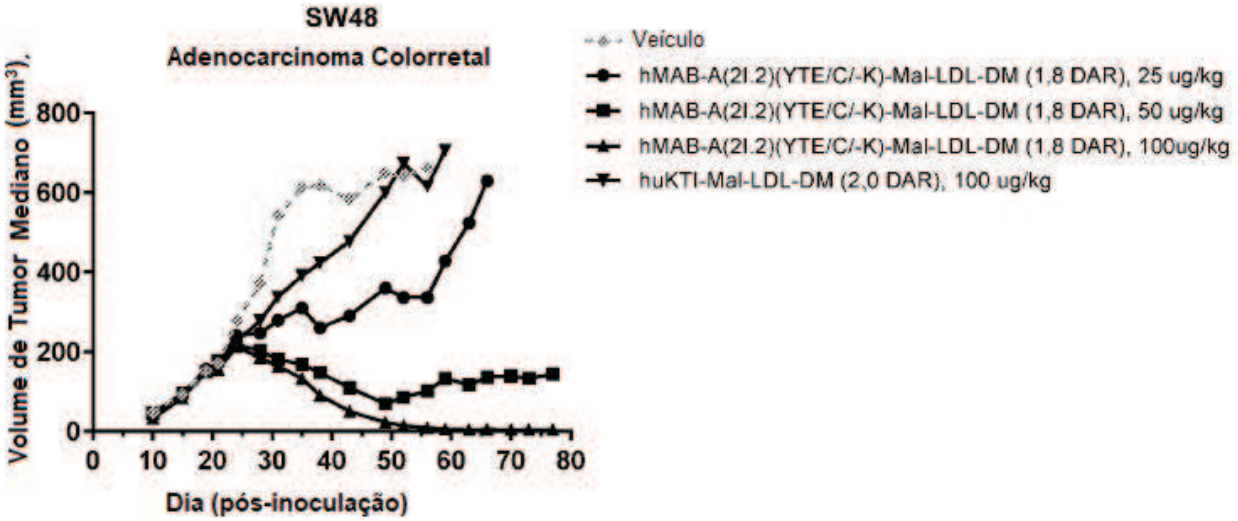
Petição 870210039407, de 30/04/2021, pág. 295/304



Tratamento	Dose (µg/kg DM)	Dose (mg/kg Ab)	% de T/C (Dia 28)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
								PR	CR	
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2,1 DAR)	25	2,18	17%	Ativo	21	1,06	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2,1 DAR)	50	4,36	2%	Altamente Ativo	34	1,68	++	6/6	1/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2,1 DAR)	100	8,76	2%	Altamente Ativo	>65	>3,26	++++	6/6	6/6	2/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2,1 DAR)	25	2,14	2%	Altamente Ativo	56	2,79	+++	6/6	3/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2,1 DAR)	50	4,28	2%	Altamente Ativo	>65	>3,26	++++	6/6	6/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2,1 DAR)	100	8,57	1%	Altamente Ativo	>65	>3,26	++++	6/6	6/6	6/6

FIG. 15

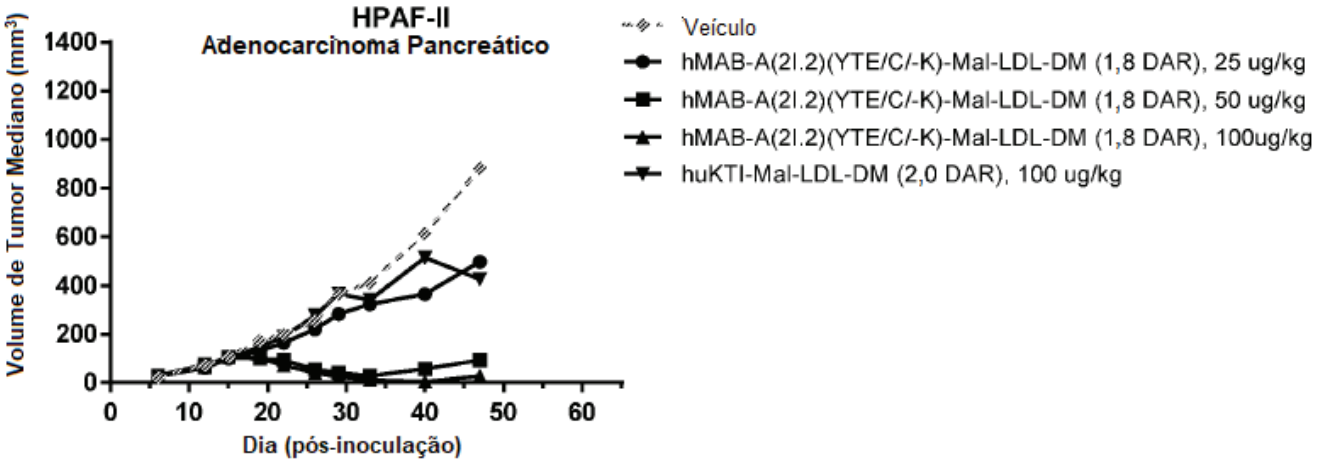
Petição 870210039470, de 30/04/2021, pág. 25/304



Tratamento	Dose (µg/kg DM)	Dose (mg/kg Ab)	% de T/C (Dia 56)	% de Resultado T/C	Regressões		TFS
					PR	CR	
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	25	2,18	51	Inativo	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	50	4,36	15	Ativo	5/8	2/8	2/8
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	100	8,57	1	Altamente Ativo	8/8	7/8	7/8
huKTI-Mal-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8,57	93	Inativo	0/8	0/8	0/8

FIG. 16

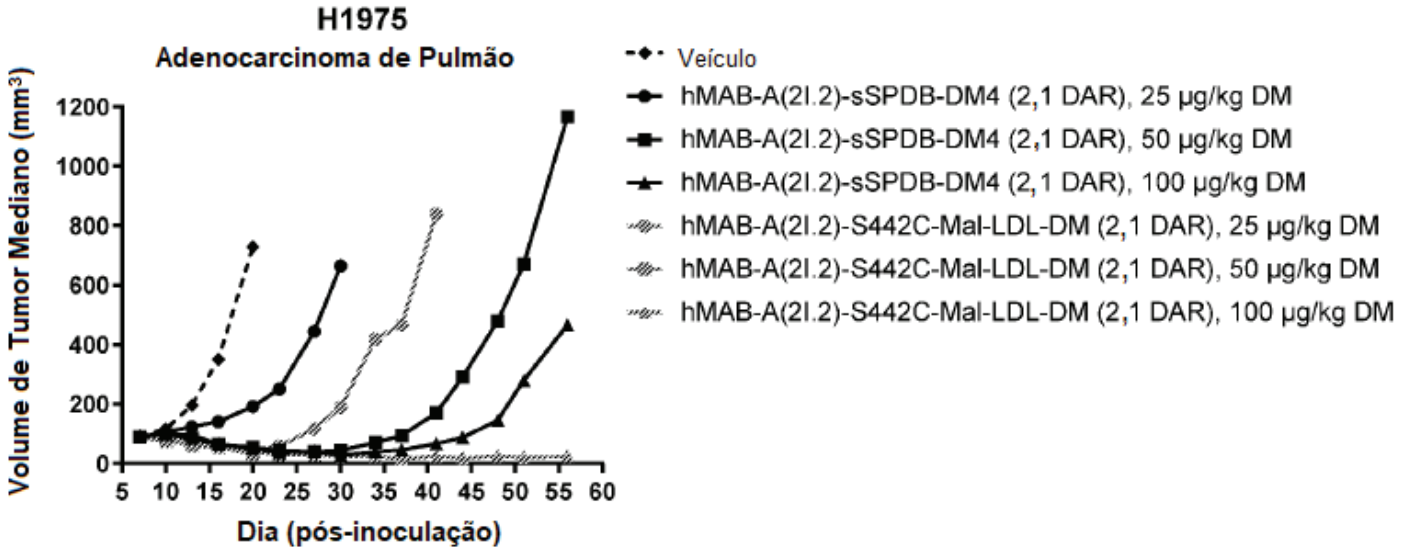
Petição 870210039407, de 30/04/2021, pág. 25/304



Tratamento	Dose (µg/kg DM)	Dose (mg/kg Ab)	% de T/C (Dia 47)	% de Resultado T/C	Regressões		TFS
					PR	CR	
hMAB-A(2l.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR)	25	2,18	56	Inativo	0/7	0/7	0/7
hMAB-A(2l.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR)	50	4,36	11	Ativo	5/7	1/7	1/7
hMAB-A(2l.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM (1,8 DAR)	100	8,57	3	Altamente Ativo	7/7	3/7	3/7
huKTI-Mal-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8,57	48	Inativo	0/7	0/7	0/7

FIG. 17

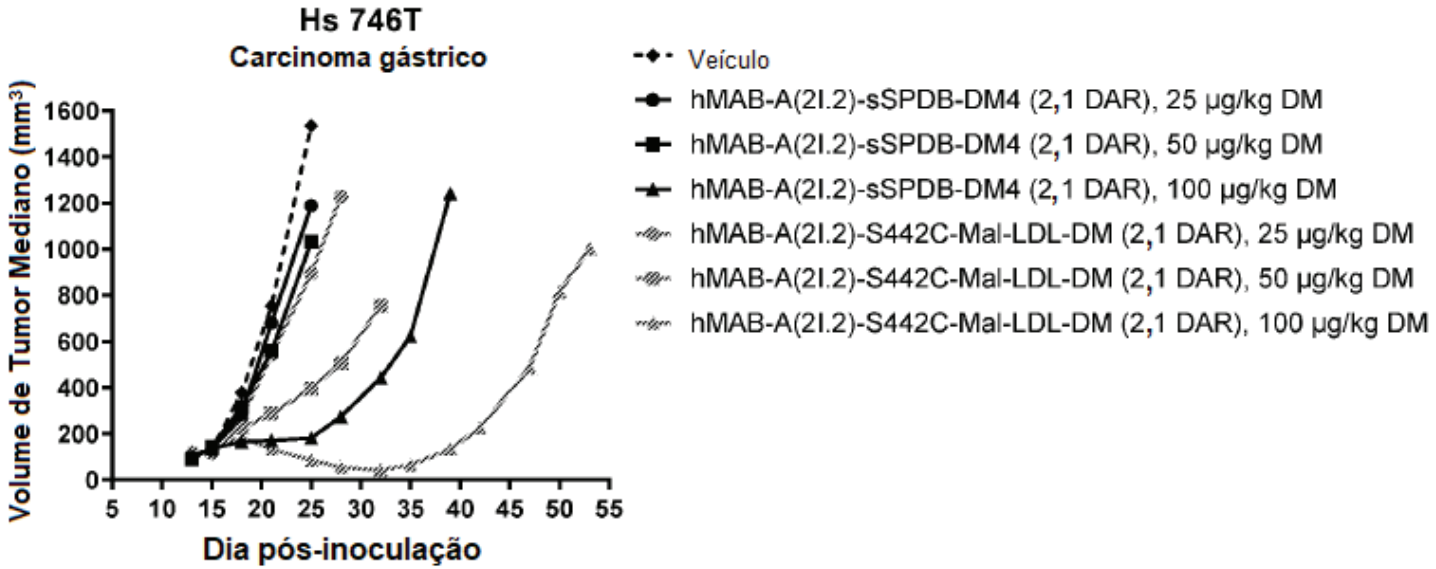
Petição 870210033947, de 30/04/2021, pág. 29/304



Tratamento	Dose (µg/kg DM)	Dose (mg/kg Ab)	% de T/C (Dia 20)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
								PR	CR	
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2,18	26%	Ativo	10	0,79	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4,36	8%	Altamente Ativo	35	2,72	+++	5/6	1/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8,76	7%	Altamente Ativo	>38	>2,98	++++	6/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2,14	6%	Altamente Ativo	ND	ND	ND	4/6	1/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4,28	4%	Altamente Ativo	ND	ND	ND	5/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8,57	6%	Altamente Ativo	>38	>2.98	++++	6/6	2/6	2/6

FIG. 18

Petição 870210039407, de 30/04/2021, pág. 29/304



Tratamento	Dose (µg/kg DM)	Dose (mg/kg Ab)	% de T/C (Dia 25)	% de Resultado T/C	T-C (dias)	LCK	Resultado LCK	Regressões		TFS
								PR	CR	
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2,18	77%	Inativo	1	0,12	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4,36	67%	Inativo	3	0,24	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8,76	12%	Ativo	15	1,35	++	1/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2,14	58%	Inativo	4	0,33	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4,28	28%	Ativo	12	1,09	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8,57	6%	Altamente Ativo	29	2,59	+++	4/6	0/6	0/6

FIG. 19

RESUMO

Patente de Invenção: **"IMUNOCONJUGADOS QUE ALVEJAM ADAM9 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a imunoconjugados que compreendem um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de se ligar especificamente a "Proteína 9 que contém Domínio Desintegrina e Metaloproteinase" ("ADAM9") conjugada com pelo menos um composto maitansinoide. A invenção refere-se particularmente a tais imunoconjugados que são de reatividade cruzada com ADAM9 humana e a ADAM9 de um primata não humano (por exemplo, um macaco cynomolgus). A invenção refere-se adicionalmente a todos os tais imunoconjugados que compreendem um Domínio Variável de Cadeia Leve (VL) e/ou a Domínio Variável de Cadeia Pesada (VH) que foi humanizado e/ou desimunizado de modo a exibir imunogenicidade reduzida mediante administração de tal imunoconjugado com um indivíduo recipiente. A invenção também é direcionada a composições farmacêuticas que contêm quaisquer tais imunoconjugados, e a métodos que envolvem o uso de quaisquer tais imunoconjugados no tratamento de câncer e outras doenças e afecções.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIAS JTD TRD P250681.txt
- Data de Geração do Código: 08/03/2021
- Hora de Geração do Código: 11:34:22
- Código de Controle:
  - Campo 1: FE83B02322891252
  - Campo 2: 543DDA49909201F5