

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COM-
POSIÇÕES E MÉTODOS PARA PREVER A RESPOSTA À TERAPIA
DIRECIONADA AO NaPi2B**".

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica benefício e prioridade ao, U.S.S.N. 62/561.107 depositado em 20 de setembro de 2017, U.S.S.N. 62/571.397 depositado em 12 de outubro de 2017 e U.S.S.N. 62/718.692, depositado em 14 de agosto de 2018; cujo todo o conteúdo é aqui incorporado por referência nas suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A invenção refere-se geralmente a composições e métodos para estratificar respondedores e não respondedores ao tratamento com conjugados anticorpo-polímero-fármaco direcionados ao NaPi2b. Também são providos métodos de subtipagem de carcinoma de pulmão de células não pequenas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] NaPi2b (SLC34A2, NaPi1b, Npt2), um transportador de fosfato dependente de sódio multi-transmembranar (Xu et al. Genomics 62: 281 a 284 (1999)), é normalmente expresso na membrana da borda em escova do intestino delgado de mamífero e participa da absorção de fosfato inorgânico (Pi) transcelular, contribuindo para a manutenção da homeostase do fosfato no corpo. A expressão de NaPi2b no nível da proteína foi detectada no fígado, na superfície apical das células epiteliais das glândulas mamárias, salivares e nos pulmões, testículos, glândula salivar, tireoide, intestino delgado e útero. Mutações no NaPi2b têm sido associadas a síndromes clínicas da microlitíase alveolar e testicular. O NaPi2b é altamente expresso em câncer de pulmão de células não pequenas não escamosas (NSCLC), câncer de ovário não mucinoso e câncer de tireoide papilar. A imunorreatividade tecidual positiva para NaPi2b está presente em 61% dos NSCLCs e em 92%

das amostras de câncer de ovário.

[004] O câncer de ovário é uma das neoplasias ginecológicas mais comuns e a quinta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. A alta taxa de mortalidade resulta em parte do diagnóstico frequente de câncer de ovário em estágios avançados e a taxa de mortalidade é de aproximadamente 65% da taxa de incidência. Os tumores epiteliais do ovário compreendem 58% de todas as neoplasias ovarianas e mais de 90% dos tumores malignos do ovário. Cirurgia de citorredução e quimioterapia combinada à base de platina (incluindo taxanos) são modalidades de tratamento atuais; no entanto, a maioria dos pacientes com câncer de ovário epitelial recidivado acaba sucumbindo à doença. Há necessidade de novas modalidades de tratamento no câncer de ovário, incluindo terapias direcionadas, como imunoterapia com anticorpos monoclonais ou abordagens baseadas em vacinas contra o câncer.

[005] NSCLC é qualquer tipo de câncer de pulmão epitelial que não seja o carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC). O NSCLC é responsável por cerca de 85% de todos os cânceres de pulmão. Como classe, os NSCLCs são relativamente insensíveis à quimioterapia, em comparação com o carcinoma de pequenas células. Quando possível, eles são tratados principalmente por ressecção cirúrgica com intenção curativa, embora a quimioterapia esteja sendo cada vez mais usada no pré-operatório (quimioterapia neoadjuvante) e no pós-operatório (quimioterapia adjuvante). No cenário metastático ou inoperante, a quimioterapia e/ou a imunoterapia são utilizadas, embora a doença nesse estágio seja amplamente incurável e o tempo de sobrevivência permaneça curto. Há uma necessidade de novas modalidades de tratamento no NSCLC, incluindo terapias direcionadas, como imunoterapia com anticorpos monoclonais ou abordagens baseadas em vacinas contra o câncer.

[006] Além disso, há a necessidade de métodos e kits de diagnóstico para prever a resposta a terapias direcionadas às atividades biológicas do NaPi2b.

SUMÁRIO

[007] Em vários aspectos, a invenção fornece métodos para prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, detectando se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente, colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b; detectar ligação entre NaPi2b e o anticorpo; e prever que o paciente será responsivo ao tratamento quando for detectada a presença de NaPi2b na amostra de tumor.

[008] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, detectando se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente, colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b; detectar ligação entre NaPi2b e o anticorpo; e pontuar a detecção patologicamente. O escore patológico se correlaciona com a capacidade de resposta ao tratamento.

[009] Em ainda um aspecto adicional, a invenção fornece métodos para prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, medindo o nível de expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente, colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b e prever que o paciente será responsivo ao tratamento quando o nível de expressão de NaPi2b na amostra de tumor for maior que um ponto de corte predeterminado.

[0010] Em vários aspectos dos métodos da invenção, os métodos incluem adicionalmente a administração de um conjugado de fármaco-

anticorpo direcionado ao NaPi2b ao indivíduo previsto como responsivo ao tratamento.

[0011] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos de tratamento de um câncer em um indivíduo com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, detectando se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente, colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b; detectar ligação entre NaPi2b e o anticorpo; prever que o paciente será responsivo ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b quando a presença de NaPi2b na amostra de tumor for detectada; e administrar um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b a um indivíduo previsto como responsivo.

[0012] Nos vários métodos, a previsão é realizada pontuando a detecção da proteína NaPi2b patologicamente. O escore patológico se correlaciona com a capacidade de resposta ao tratamento. O escore patológico é um escore quantitativo ou semiquantitativo. Por exemplo, o escore patológico é determinado por microscopia de luz ou análise de imagem.

[0013] Alternativamente, a previsão é realizada determinando que o nível de expressão de NaPi2b na amostra de tumor é superior a um ponto de corte predeterminado. O ponto de corte predeterminado é calculado, por exemplo, pelo método escore H.

[0014] Em um aspecto adicional, a invenção fornece métodos para subtipar um carcinoma de pulmão de células não pequenas como adenocarcinoma, detectando se NaPi2b está presente em uma amostra de carcinoma de células não pequenas, colocando em contato a amostra com um anticorpo anti-NaPi2b e detectando a ligação entre NaPi2b e o anticorpo; e subtipar um carcinoma de pulmão de células não pequenas como adenocarcinoma quando a presença de NaPi2b na amostra for detectada. Opcionalmente, o método inclui adicional-

mente a detecção de um ou mais TTF-1, Napsina A, p63, p40 ou CK5/6 em uma amostra de carcinoma de pulmão de células não pequenas.

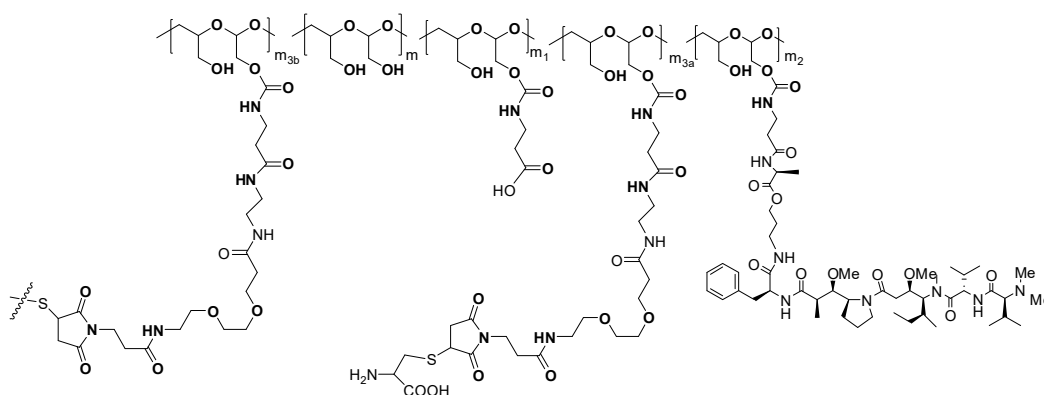
[0015] O câncer é um câncer que expressa NaPi2b. Exemplos de incluem, mas não estão limitados a, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de rim, câncer de tireoide, câncer renal, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial, colangiocarcinoma, câncer de tireoide papilar ou câncer renal papilar. O câncer de pulmão é, por exemplo, carcinoma pulmonar não pequeno (NSCLC). Em alguns aspectos, o NSCLC é um NSCLC não escamoso. Em alguns aspectos, o NSCLC é subtipo de adenocarcinoma. O câncer de ovário é, por exemplo, câncer de ovário epitelial. O câncer de ovário é, por exemplo, câncer de ovário sensível à platina. O câncer de ovário é, por exemplo, câncer de ovário refratário à platina.

[0016] O anticorpo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é XMT-1535. Preferencialmente, o anticorpo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b compreende: uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo a sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo a sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo a sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 6), uma

região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

[0017] O conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é, por exemplo, um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b à base de auristatina.

[0018] O conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b tem a seguinte fórmula:



em que:

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,

m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,

m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,

m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8;

a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 18; e

a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , e m_{3b} varia de 15 a cerca de 300;

o terminal $\begin{matrix} \text{---} \\ \text{---} \end{matrix}$ denota a união de uma ou mais estruturas poliméricas ao anticorpo XMT-1535 direcionado ao NaPi2b.

[0019] A detecção é realizada, por exemplo, imuno-histoquimicamente. Preferencialmente, o anticorpo anti-NaPi2b é detectado usando um anticorpo secundário etiquetado.

[0020] O anticorpo anti-NaPi2b é um anticorpo quimérico. O anti-

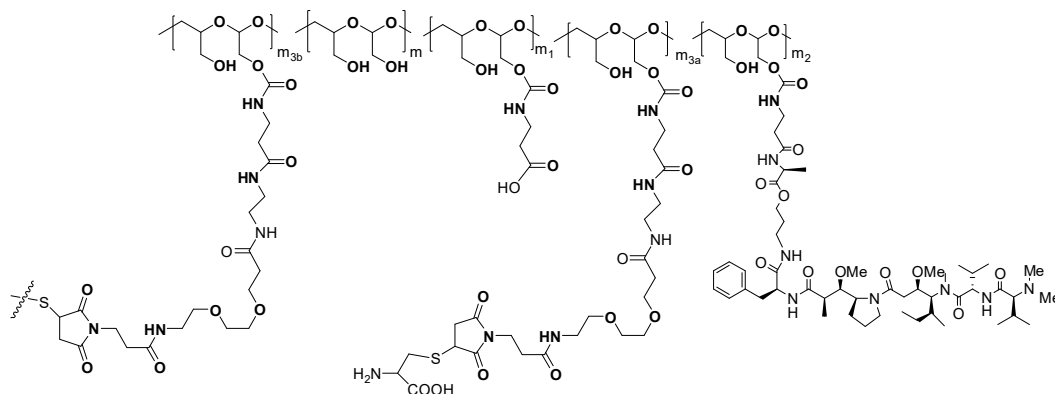
corpo quimérico compreendendo uma região variável humana e uma região constante não humana. O anticorpo quimérico compreende a região variável do anticorpo XMT-1535. A região constante não humana é o coelho.

[0021] A amostra é, por exemplo, mas não limitada a uma amostra embebida em parafina e fixada em formalina.

[0022] A invenção fornece adicionalmente um anticorpo quimérico compreendendo: uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo a sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo a sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo a sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos YTSS-LYS (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8). Em alguns aspectos, o anticorpo quimérico inclui a cadeia pesada variável da SEQ ID No: 1 e a cadeia leve variável da SEQ ID No: 2. A região constante é, por exemplo, mas não limitada a, uma região constante de coelho. Por exemplo, o anticorpo quimérico inclui uma região constante da cadeia pesada de IgG1 de coelho e uma cadeia leve da região constante kappa de coelho. Em modalidades preferidas, o anticorpo quimérico tem a região constante de cadeia pesada da SEQ ID NO: 11 e a região constante de cadeia leve da SEQ ID NO: 12

[0023] Também incluem na invenção os plasmídeos contendo o ácido nucleico da SEQ ID NO: 17 e/ou SEQ ID NO: 18 e células contendo o plasmídeo.

[0024] Também estão incluídos na invenção métodos de tratamento de câncer de tireoide papilar, câncer renal papilar, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial ou colangiocarcinoma compreendendo a administração ao indivíduo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b em uma quantidade suficiente para aliviar o sintoma do câncer. O conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é por exemplo qualquer conjugado descrito em WO 2017/160754. Por exemplo, o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é:



em que:

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,

m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,

m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,


m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8;

a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 18;

a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , e m_{3b} varia de 15 a cerca de

300; e

o terminal  denota a união de uma ou mais estruturas poliméricas ao anticorpo XMT-1535 direcionado ao NaPi2b.

[0025] Salvo definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o comumente entendido por um especialista na técnica a que esta descrição pertence. No relatório descritivo, as formas singulares também incluem o plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

[0026] Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição e reivindicações detalhadas a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0027] A Figura 1 ilustra o projeto de um anticorpo quimérico baseado no anticorpo anti-NaPi2b humanizado, XMT-1535. O anticorpo quimérico é aqui referido como MERS67.

[0028] A Figura 2 é uma fotografia mostrando a análise por SDS-PAGE e Western blot do anticorpo Mers67.

[0029] A Figura 3A mostra a análise SEC-HPLC de MERS67 após purificação de uma etapa.

[0030] A Figura 3B mostra a análise SEC-HPLC de MERS67 após purificação de duas etapas.

[0031] A Figura 4 é uma fotografia mostrando coloração imunohistoquímica representativa nos xenoenxertos de OVCAR3 e JIMT-1

[0032] A Figura 5 mostra a coloração imunohistoquímica em dois adenocarcinomas de pulmão humano.

[0033] A Figura 6 é um gráfico de barras que mostra a melhor resposta mediana de um ensaio clínico de ovário de camundongo usando um conjugado fármaco-anticorpo de polímero direcionado ao NaPi2b

descrito em WO 2017/160754, n=3, 3 mg/kg qweekx3. O eixo y mostra a melhor resposta mediana; o eixo x mostra o número do modelo. As barras coloridas mais escuras indicam tumores sem tratamento e as barras coloridas mais claras indicam tumores pós-tratamento.

[0034] A Figura 7 é um gráfico de barras mostrando os modelos START Ovarian, ordenados pela melhor resposta mediana; e colorido pelo score H (todos os modelos). Quanto mais escura a cor, maior o H. O eixo y mostra a melhor resposta mediana; o eixo x mostra o número do modelo.

[0035] A Figura 8 é um gráfico de dispersão mostrando tumores e xenoenxertos humanos de pulmão e ovário. Representado graficamente por pontuações H (eixo y) e tipo de tecido (eixo x), colorido pela melhor resposta mediana para os xenoenxertos. Cores mais claras correspondem a um efeito mais antitumoral; cores escuras correspondem a menos efeito antitumoral.

[0036] A Figura 9 é um gráfico de curva de distribuição e variância (Box Plot) que mostra os dados de RNAseq extraídos de TCGA mostrando a expressão diferencial de NaPi2b, Napsina A, CK5 e TTF1 no SCC e ACC de pulmão. Painéis imuno-histoquímicos que detectam a expressão de proteínas de painéis como Napsina A, CK5 e TTF1 podem ser usados na classificação de carcinoma de pulmão de células escamosas e adenocarcinoma de pulmão. A detecção da expressão de NaPi2b pode ser usada para complementar o painel atualmente usado.

[0037] A Figura 10 é um gráfico de dispersão mostrando os dados de RNAseq extraídos do TCGA. NaPi2b é mostrado no eixo x e Napsina A é mostrada no eixo y. A expressão da citoqueratina 5 é indicada pela cor, sendo o mais escuro o nível de expressão mais alto. A maioria dos tecidos anotados como carcinoma de células escamosas (forma de círculo) está contida na forma oval de linha cheia. A maioria dos

tecidos anotados como adenocarcinoma (forma quadrada) está no quadrante superior direito do gráfico. Alguns tumores classificados como área de carcinoma de células escamosas também localizados no quadrante superior direito, são marcados com o círculo tracejado e são baixos expressores de citoqueratina. O uso de um marcador de proteína, como NaPi2b, pode refinar a classificação de tumores como os do círculo tracejado.

[0038] A Figura 11 mostra dados provisórios de TCGA de 21 de maio de 2018 de SCC e ACA pulmonar extraídos do cBioPortal e representados graficamente para mostrar a relação da expressão de RNA de NaPi2b em comparação com os genes TTF-1, Napsina A, CK5 e p63, alguns genes cujos produtos de proteína são frequentemente usados para distinguir o SCC do ACA. A linha superior mostra os resultados de RNA do ACA e, na linha inferior, os resultados de RNA do SCC. NaPi2b é mostrado no eixo x.

[0039] A Figura 12 mostra os dados provisórios de RNAseq do TCGA em 21 de maio de 2018 de SCC e ACA pulmonar extraídos do cBioPortal e representados graficamente individualmente para mostrar a relação dos genes SCL34A2, TTF-1, Napsina-A, Caps e p63 para ACA e SCC. Em cada gráfico, os resultados do ACA estão à esquerda e os dados do SCC à direita. O eixo y é uma medida da expressão do RNA, conforme determinado pelo RNAseq.

[0040] A Figura 13 mostra as pontuações H obtidas da avaliação NaPi2B IHC de um microarranjo tecidual de tumores de SCC e ACA.

[0041] A Figura 14 é um gráfico de curva de distribuição e variância de escores H do mesmo conjunto de tecidos quando o subtipo de histologia foi caracterizado adicionalmente usando colorações de IHC de p40 e TTF-1.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0042] A presente invenção fornece composição e métodos para

identificar o indivíduo que responderia a um conjugado fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b (como o conjugado fármaco-polímero-anticorpo de NaPi2b).

[0043] A presente invenção é baseada em parte na descoberta de que um conjugado fármaco-polímero-anticorpo de NaPi2b (ADC) composto por um anticorpo IgG1 totalmente humanizado contra NaPi2b, XMT-1535, mostrou efeito antitumoral em modelos de câncer de pulmão e ovário. (Ver WO 2017/160754, cujo conteúdo é incorporado por referência na sua totalidade). A eficácia de um ADC é devida, pelo menos em parte, ao grau ou padrão de expressão do alvo em um tumor ou modelo de tumor. A fim de descrever com precisão o padrão de expressão de NaPi2b em modelos de tumores humanos e em tumores humanos primários, um reagente, MERS67 (isto é, MER67) foi desenvolvido e validado para imuno-histoquímica (IHC). Compreendendo a expressão de NaPi2b em tumores humanos fornecerá uma terapia mais racional e personalizada para pacientes com cânceres que expressam NaPi2b.

[0044] MERS67 é um anticorpo quimérico de coelho humano que foi baseado no anticorpo anti-NaPi2b humanizado, XMT-1535. XMT-1535 é a porção de anticorpo de ADC descrita em WO 2017/160754. Especificamente, MERS67 contém a região da cadeia leve e pesada humana de XMT-1535 anexada a uma região constante de IgG1 de coelho ou à região C da cadeia kappa-b4 de Ig de coelho, respectivamente.

[0045] Por conseguinte, a presente invenção fornece em parte, um anticorpo quimérico NaPi2b. Mais especificamente, a presente invenção fornece um anticorpo quimérico NaPi2b com base nas regiões variáveis de XMT-1535. A invenção fornece adicionalmente métodos de prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado

ao NaPi2b descrito em WO 2017/160754, determinando os níveis de expressão de NaPi2b da amostra de tumor. Em modalidades específicas, os níveis de expressão de NaPi2b da amostra de tumor são determinados imuno-histoquimicamente usando MERS67.

[0046] A presente invenção também fornece, em parte, um método para identificar pacientes que se beneficiariam do tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, descrito em WO 2017/160754 (i) determinando os níveis de expressão de NaPi2b da amostra de tumor, conforme determinado imuno-histoquimicamente usando MERS67 e (ii) informando o paciente que eles se beneficiariam do tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b.

[0047] A presente invenção também fornece, em parte, um método para prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, compreendendo as etapas de (i) determinar os níveis de expressão de NaPi2b da amostra de tumor como determinado imuno-histoquimicamente usando MERS67 e (ii) classificar o paciente como tendo uma alta probabilidade de responder ao tratamento em que um nível de NaPi2b na amostra de tumor obtido do paciente em um ponto de corte predeterminado ou superior a um ponto de corte predeterminado indica que o paciente tem maior probabilidade de benefício do tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b. A presente invenção também fornece em parte um método para determinar a probabilidade de um paciente com câncer exibir benefício com o tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, o método compreendendo: determinar um nível de expressão de NaPi2b em uma amostra obtida da paciente, em que um nível de NaPi2b na amostra obtida do paciente em um ponto de corte predeterminado ou superior indica que o

paciente tem maior probabilidade de benefício da terapia anticâncer.

[0048] A presente invenção também fornece em parte um método para otimizar a eficácia terapêutica de uma terapia anticâncer compreendendo um conjugado de fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, o método compreendendo: determinar os níveis de expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente, em que um nível de NaPi2b na amostra obtida do paciente em um ponto de corte pré-determinado ou superior a ele indica que o paciente tem maior probabilidade de benefício da terapia com conjugado de fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b.

[0049] A presente invenção também fornece em parte um método para o tratamento de câncer em um paciente, o método compreendendo determinar que uma amostra de tumor obtida do paciente possui um nível de NaPi2b igual ou superior ao nível de NaPi2b em uma amostra de referência e administrar uma quantidade eficaz de um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b ao dito paciente, pelo qual o câncer é tratado.

[0050] A presente invenção também fornece em parte um método para monitorar a eficácia do tratamento de câncer em um paciente, o método compreendendo determinar que uma amostra de tumor obtida do paciente possui um nível de NaPi2b igual ou superior ao nível de NaPi2b em uma amostra de referência e administrar uma quantidade eficaz de um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b ao dito paciente, pelo qual o câncer é tratado.

[0051] A presente invenção permite que os oncologistas aumentem o monitoramento e/ou forneçam intervenções ou tratamentos preventivos mais agressivos e ideais para subconjuntos específicos de pacientes.

Anticorpos de NaPi2b quiméricos

[0052] A presente invenção fornece anticorpos quiméricos tendo

regiões variáveis humanas e regiões constantes não humanas. Especificamente, os anticorpos quiméricos aqui descritos reconhecem especificamente a expressão de NaPi2b. As regiões variáveis humanas exemplificativas usadas nos anticorpos quiméricos aqui descritos incluem, por exemplo, as regiões variáveis do anticorpo anti-NaPi2b descritas em WO 2017/160754 e denominadas XMT-1535. Os anticorpos XMT-1535 mostram especificidade para NaPi2b humano e demonstraram inibir a atividade funcional de NaPi2b in vitro.

[0053] Um anticorpo de NaPi2b quimérico específico, de acordo com a invenção, inclui uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL), como mostrado nas sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos apresentadas abaixo.

[0054] As regiões determinantes de complementariedade (CDRs) da cadeia pesada e da cadeia leve estão sublinhadas nas sequências de aminoácidos apresentadas abaixo. Os aminoácidos que abrangem as regiões determinantes da complementariedade (CDRs) para o anticorpo XMT-1535 são como definidos por E.A. Kabat et al. (Ver Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)) e são descritos na Patente dos EUA 8.603.474, e os aminoácidos que abrangem as CDRs para o anticorpo 10H1.11.4B são como definidos na Patente dos EUA N° 8.535.675.

Sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de XMT-1535

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNIHWVKQAPGQG
LEWIGAIYPGNGDTSYKQKFRGRATLTADTSTSTVYMESSLRSE
DSAVYYCARGETARATFAYWGQGLTVVSSG (SEQ ID NO: 1)

CDRH1 GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3)

CDRH2 AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4)

CDRH3 GETARATFAY (SEQ ID NO: 5)

Sequência de ácidos nucleicos da região variável de cadeia pesada de XMT-1535

CAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAGGTTGTGAAACCTG
 GCGCCTCTGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTT
 CACCGGCTACAACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCTGGACAG
 GGA CT CGAATGGATCGGAGCCATCTATCCCGGCAACGGCGACA
 CCAGCTACAAGCAGAAGTTCCGGGGCAGAGCCACACTGACCGC
 CGATAACAAGCACCAGCACCGTGTACATGGA ACTGAGCAGCCTG
 AGAAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGCGAAA
 CAGCCAGAGCCACCTTTGCCTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTTAGCTCT (SEQ ID NO: 9)

Sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de XMT-1535

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDIGNFLN WYQQKPGKTVKVLII
 Y YTSSLYSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYSKLP
LTFGQGTKLELKR (SEQ ID NO: 2)

CDRL1 SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6)

CDRL2: YTSSLYS (SEQ ID NO: 7)

CDRL3: QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8)

Sequência de ácidos nucleicos da região variável de cadeia leve de XMT-1535

GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTG
 GGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGATATCGG
 CAACTTCCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGACCGTGAA
 GGTGCTGATCTACTACACCTCCAGCCTGTACAGCGGCGTGCCCA
 GCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACC
 ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA
 GCAGTACAGCAAGCTGCCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAG
 CTGGAACTGAAG (SEQ ID NO: 10)

[0055] A região constante dos anticorpos quiméricos de acordo

com a invenção pode ser derivada de qualquer espécie que não seja humana. Por exemplo, as regiões constantes das cadeias pesada e leve derivadas de, por exemplo, mas não limitadas a, um coelho, camundongo, rato, cavalo, vaca ou galinha.

[0056] Em alguns aspectos, o anticorpo quimérico de acordo com a invenção inclui uma região constante da cadeia pesada de coelho e uma região constante da cadeia leve de coelho. Por exemplo, o anticorpo quimérico de acordo com a invenção inclui uma região constante de IgG1 de coelho e uma região constante kappa de IG de coelho.

[0057] Em uma modalidade preferida, o anticorpo quimérico de acordo com a invenção inclui uma região constante de cadeia pesada (VH) de coelho e uma região variável da cadeia leve (VL), como mostrado nas sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos apresentadas abaixo.

[0058] Sequência de aminoácidos da região constante de IgG1 de coelho

GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTL
 TNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVD
 KTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIA
 HEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP
 REELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDS
 DGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRS-
 PGK (SEQ ID NO:11)

[0059] Sequência de aminoácidos da região constante kappa-b4 de Ig de coelho

RDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQ
 TTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQG-
 TTSV VQSFNRGDC (SEQ ID NO:12)

[0060] Sequência de ácidos nucleicos da região constante de IgG1

de coelho

GGACAGCCTAAGGCTCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTG
TGGCGATACCCCTAGCAGCACAGTGACACTGGGCTGTCTGGTCA
AGGGCTACCTGCCTGAACCTGTGACCGTGACCTGGAATAGCGGC
ACCCTGACCAACGGCGTGCGGACATTTCCCTAGCGTCAGACAGA
GCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTGTCTGTGACCAG
CAGCTCTCAGCCTGTGACCTGCAATGTGGCCCATCCTGCCACCA
ACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTCCCTCCACCTGTAGCAAG
CCCACATGTCCTCCACCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTCCGTGTT
TATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAAC
CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGATGAT
CCTGAGGTGCAGTTCACCTGGTACATCAACAACGAGCAAGTGCG
GACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTCAACAGCACC
ATCAGAGTGGTGTCTACCCTGCCTATCGCTCACGAGGATTGGCT
GCGGGGCAAAGAGTTCAAGTGCAAGGTGCACAACAAGGCCCTG
CCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAGAGGCCAGCC
ACTGGAACCCAAGGTGTACACAATGGGCCCTCCAAGAGAGGAAC
TGTCCAGCAGATCCGTGTCTCTGACCTGCATGATCAACGGCTTC
TACCCAGCGACATCAGCGTGAATGGGAGAAGAATGGCAAGG
CCGAGGACAACACTACAAGACAACCCCTGCCGTGCTGGATAGCGA
CGGCAGCTACTTCCTGTACAGCAAGCTGAGCGTGCCACCTCT
GAATGGCAACGGGGAGATGTGTTTACCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCAGCAGGTCC
CCAGGCAAA(SEQID NO:13)

[0061] Sequência de ácidos nucleicos da região constante kappa-
b4 de Ig de coelho

AGGGATCCTGTGGCTCCCACCGTGCTGATTTTTCCACCAGCCGC
TGATCAGGTGGCCACTGGCACAGTGACAATCGTGTGCGTGGCC
AACAAGTACTTCCCCGACGTGACCGTGACCTGGGAAGTCGATGG
CACCACACAGACCACAGGCATCGAGAACAGCAAGACCCCTCAGA

ACAGCGCCGACTGCACCTACAACCTGAGCAGCACCCCTGACACT
 GACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGTAAAG
 TCACCCAGGGCACAACCAGCGTGGTGCAGAGCTTCAACAGAGG
 CGATTGC(SEQ ID NO:14)

[0062] Em uma modalidade mais preferida, o anticorpo de NaPi2b quimérico, MERS67, inclui uma sequência de aminoácidos e ácidos nucleicos de cadeia pesada e leve apresentada abaixo.

[0063] Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo de NaPi2b quimérico

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNIIHWVKQAPGQGL
 EWIGAIYPNGDTSYKQKFRGRATLTADTSTSTVYMELSSLRSEDSA
 VYYCARGETARATFAYWGQGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTP
 SSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSL
 SSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELL
 GGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNE
 QVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKAL
 PAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPS
 DISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGD
 VFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO:15)

[0064] Sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo de NaPi2b quimérico

[0065] DIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCSASQDIGNFLNWFYQQKP
 GKTVKVLIYYTSSLYSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYC
 QQYSKLPLTFGQGTKLELKRDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVA
 NKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTS
 TQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:16)

[0066] Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada do anti-
 corpo de NaPi2b quimérico

CAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAGGTTGTGAAACCTG
 GCGCCTCTGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTT

CACCGGCTACAACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCTGGACAG
GGA CT CGAATGGATCGGAGCCATCTATCCCGGCAACGGCGACA
CCAGCTACAAGCAGAAGTTCCGGGGCAGAGCCCACTGACCGC
CGATAACAAGCACCAGCACCGTGTACATGGA ACTGAGCAGCCTGA
GAAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGGCGAAAC
AGCCAGAGCCACCTTTGCCTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTTAGCTCTGGACAGCCTAAGGCTCCCAGCGTGTTCCCTCT
GGCTCCTTGCTGTGGCGATACCCCTAGCAGCACAGTGACACTG
GGCTGTCTGGTCAAGGGCTACCTGCCTGAACCTGTGACCGTGA
CCTGGAATAGCGGCACCCTGACCAACGGCGTGCGGACATTTCC
TAGCGTCAGACAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG
GTGTCTGTGACCAGCAGCTCTCAGCCTGTGACCTGCAATGTGG
CCCATCCTGCCACCAACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTC
CCTCCACCTGTAGCAAGCCCACATGTCCTCCACCAGAGCTGCT
CGGAGGCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGT
GGACGTGTCCGAGGATGATCCTGAGGTGCAGTTCACCTGGTACA
TCAACAACGAGCAAGTGCGGACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAG
CAGCAGTTCAACAGCACCATCAGAGTGGTGTCTACCCTGCCTATC
GCTCACGAGGATTGGCTGCGGGGCAAAGAGTTCAAGTGCAAGGT
GCACAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAA
GGCCAGAGGCCAGCCACTGGAACCCAAGGTGTACACAATGGGCC
CTCCAAGAGAGGAACTGTCCAGCAGATCCGTGTCTCTGACCTGCA
TGATCAACGGCTTCTACCCAGCGACATCAGCGTGGAATGGGAG
AAGAATGGCAAGGCCGAGGACA ACTACAAGACAACCCCTGCCG
TGCTGGATAGCGACGGCAGCTACTTCCCTGTACAGCAAGCTGAG
CGTGCCACCTCTGAATGGCAACGGGGAGATGTGTTTACCTGCA
GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAAGTCC
ATCAGCAGGTCCCCAGGCAA (SEQ ID NO:17)

[0067] Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve do anticorpo

de NaPi2b quimérico

GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGT
 GGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGATATC
 GGCAACTTCCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGACCGT
 GAAGGTGCTGATCTACTACACCTCCAGCCTGTACAGCGGCGTGC
 CCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACACCCTG
 ACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
 CCAGCAGTACAGCAAGCTGCCCCTGACATTTGGCCAGGGCAC-
 CAAGCTGGAAGTGAAGAGGGATCCTGTGGCTCCCACCGTGC
 TGATTTTTCCACCAGCCGCTGATCAGGTGGCCACTGGCACAG
 TGACAATCGTGTGCGTGGCCAACAAGTACTTCCCCGACGTGAC
 CGTGACCTGGGAAGTCGATGGCACCCACACAGACCACAGGCAT
 CGAGAACAGCAAGACCCCTCAGAACAGCGCCGACTGCACCTA
 CAACCTGAGCAGCACCCCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACA
 GCCACAAAGAGTACACCTGTAAAGTCACCCAGGGCACAACCAG
 CGTGGTGCAGAGCTTCAACAGAGGCGATTGC (SEQ ID NO:18)

[0068] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos ALYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4); e uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5).

[0069] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 7); e uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 3 (CDRL3) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

[0070] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma CDRH1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); uma CDRH2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4); uma CDRH3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5); uma CDRL1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); uma CDRL2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos YTSSLYS

(SEQ ID NO: 7); e uma CDRL3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

[0071] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região de cadeia pesada variável (VH) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99 % ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0072] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região VH compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, e uma região VL compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98 %, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

[0073] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG

(SEQ ID NO: 4); e uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5).

[0074] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 7); e uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 3 (CDRL3) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

[0075] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma CDRH1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); uma CDRH2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4); uma CDRH3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5); uma CDRL1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); uma CDRL2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 7); e uma CDRL3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

[0076] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região da cadeia pesada variável (VH) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região de cadeia leve variável (VL) compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0077] Em algumas modalidades, o anticorpo de NaPi2b quimérico inclui uma região VH compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, e uma região VL compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

[0078] Os especialistas na técnica reconhecerão que é possível determinar, sem experimentação indevida, se um anticorpo quimérico tem a mesma especificidade que um anticorpo quimérico aqui descrito (por exemplo, MERS67), determinando se o primeiro impede que o último se ligue a um parceiro de ligação natural ou outra molécula conhecida por estar associada ao NaPi2b. Se o anticorpo sendo testado competir com o anticorpo quimérico aqui descrito, como mostrado por uma diminuição na ligação pelo anticorpo quimérico aqui descrito, então os dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo ou a um epítopo intimamente relacionado.

[0079] Um método alternativo para determinar se um anticorpo monoclonal tem a especificidade do anticorpo monoclonal aqui descrito é pré-incubar o anticorpo quimérico aqui descrito com NaPi2b solúvel (com o qual é normalmente reativo) e, em seguida, adicionar o anticorpo sendo testado para determinar se o anticorpo sendo testado é inibido em sua capacidade de se ligar ao NaPi2b. Se o anticorpo sendo testado for inibido, com toda a probabilidade, ele tem a mesma especificidade epitópica, ou funcionalmente equivalente, que o anticorpo quimérico aqui descrito.

[0080] A triagem de anticorpos quiméricos aqui descritos também pode ser realizada, por exemplo, medindo a atividade mediada por NaPi2b e determinando se o anticorpo quimérico de teste é capaz de modular, bloquear, inibir, reduzir, antagonizar, neutralizar ou interferir com a atividade de NaPi2b.

[0081] Os anticorpos quiméricos podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Patente dos EUA N° 4.816.567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais aqui descritos pode ser facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as

cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma aqui descritos servem como uma fonte preferida desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados para células hospedeiras, como células COS símias, células HEK293, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e leve humana no lugar das sequências murinas homólogas (ver Patente dos EUA nº 4.816.567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) ou unindo covalentemente à sequência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo não-imunoglobulina. Esse polipeptídeo não-imunoglobulina pode ser substituído pelos domínios constantes de um anticorpo aqui descrito, ou pode ser substituído pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígenos de um anticorpo descrito aqui para criar um anticorpo bivalente quimérico.

[0082] Um anticorpo de NaPi2b quimérico é gerado, por exemplo, usando os procedimentos descritos nos Exemplos fornecidos abaixo.

[0083] Os anticorpos de NaPi2b quiméricos aqui descritos podem ser expressos por um plasmídeo ou vetor contendo um segmento de DNA que codifica o anticorpo descrito acima. O plasmídeo ou vetores podem ser transfectados em células para expressão. Por exemplo, as células são células HEK293 ou células CHO.

[0084] Estes vetores, plasmídeo e células podem ser usados para expressar grandes quantidades de anticorpos que podem ser usados de várias maneiras. Por exemplo, para detectar a presença de NaPi2b em uma amostra.

[0085] Os anticorpos são purificados por técnicas bem conhecidas,

como cromatografia de afinidade usando proteína A ou proteína G, que fornecem principalmente a fração de IgG do soro imune. Subsequentemente, ou alternativamente, o antígeno específico que é o alvo da imunoglobulina procurada, ou um epítipo do mesmo, pode ser imobilizado em uma coluna para purificar o anticorpo imuno específico por cromatografia de imunoafinidade. A purificação de imunoglobulinas é discutida, por exemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (17 de abril de 2000), pp. 25-28).

[0086] Os anticorpos quiméricos aqui descritos também são úteis na detecção de NaPi2b em amostras de pacientes e, portanto, são úteis como diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos de NaPi2b aqui descritos são usados em ensaios in vitro, por exemplo, IHC, ELISA, para detectar níveis de NaPi2b em uma amostra de paciente.

Conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b

[0087] Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ao NaPi2b, XMT-1535, pode ser conectado a um agente para formar um conjugado. Em algumas modalidades, o agente é um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o agente é um agente antineoplásico. Em algumas modalidades, o agente é uma toxina ou fragmento da mesma. Em algumas modalidades, o agente é (a) um composto de auristatina; (b) um composto de caliqueamicina; (c) um composto de duocarmicina; (d) SN38, (e) uma pirrolbenzodiazepina; (f) um composto de vinca; (g) um composto de tubulisina; (h) um composto de campotecina não natural; (i) um composto maitansinoide; (j) um fármaco de ligação ao DNA; (k) um inibidor de quinase; (l) um inibidor de MEK; (m) um inibidor de KSP; (n) um inibidor da topoisomerase; (o) um fármaco alquilante de DNA; (p) um inibidor de RNA polimerase; ou análogos dos mesmos. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao anticorpo direcionado ao NaPi2b por meio de um ligante. Em algumas

modalidades, o ligante é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, o agente é qualquer uma das toxinas aqui descritas.

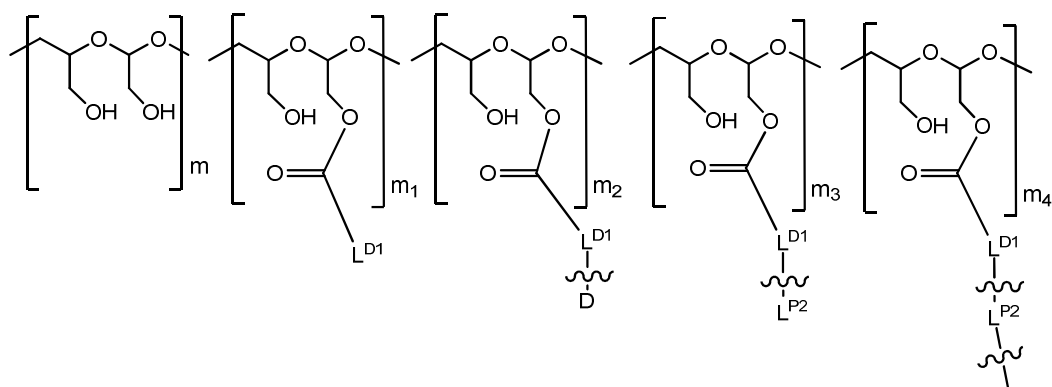
[0088] Em um aspecto, o conjugado de anticorpo direcionado ao NaPi2b aqui descrito inclui um anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, conectado direta ou indiretamente a um ou mais agentes terapêuticos ou de diagnóstico ("D"). Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo direcionado ao NaPi2b também inclui uma ou mais estruturas poliméricas conectadas ao anticorpo, em que cada um dos um ou mais D é conectado independentemente ao anticorpo através das uma ou mais estruturas poliméricas. Em algumas modalidades, o um ou mais D é AF-HPA.

[0089] Em algumas modalidades, cada uma das uma ou mais estruturas poliméricas que estão conectadas ao XMT-1535 compreende poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetil-formal) (PHF), por exemplo, PHF com um peso molecular que varia de cerca de 2 kDa a cerca de 40 kDa. Em outras modalidades, o PHF tendo um peso molecular variando de cerca de 2 kDa a cerca de 20 kDa. Em algumas modalidades, o PHF tendo um peso molecular variando de cerca de 3 kDa a cerca de 15 kDa. Em outras modalidades, o PHF tendo um peso molecular variando de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa.

[0090] Em algumas modalidades, o PHF tem um peso molecular variando de cerca de 6 kDa a cerca de 8 kDa.

[0091] Em algumas modalidades, o PHF tem um peso molecular variando de cerca de 6 kDa a cerca de 7 kDa.

[0092] Em algumas modalidades, cada uma das uma ou mais estruturas poliméricas independentemente é de Fórmula (I):



(I),

em que:

L^{D1} é uma porção contendo carbonila;

cada ocorrência de $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---}$ em $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$ é independentemente um primeiro ligante que contém uma ligação biodegradável, de modo que quando a ligação é quebrada, D é liberado em uma forma ativa para o seu efeito terapêutico pretendido; e o $\xi\text{---}$ em $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$ entre L^{D1} e D indica união direta ou indireta de D ao L^{D1} ;

cada ocorrência de $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$ é independentemente um segundo ligante ainda não conectado ao anticorpo isolado, em que L^{P2} é uma porção que contém um grupo funcional que ainda está para formar uma ligação covalente com um grupo funcional do anticorpo isolado e o $\xi\text{---}$ entre L^{D1} e L^{P2} indica união direta ou indireta de L^{P2} ao L^{D1} , e cada ocorrência do segundo ligante é distinta de cada ocorrência do primeiro ligante;

cada ocorrência de $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}\text{---}\xi\text{---}$ é independentemente um terceiro ligante que conecta cada estrutura polimérica portadora de D ao anticorpo isolado no qual o terminal $\xi\text{---}$ unido ao

L^{P2} indica união direta ou indireta de L^{P2} ao anticorpo isolado após a formação de uma ligação covalente entre um grupo funcional de L^{P2} e um grupo funcional do anticorpo isolado; e cada ocorrência do terceiro ligante é distinta de cada ocorrência do primeiro ligante;

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,
 m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,
 m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,
 m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 18,
 m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 10;
a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 varia de 15 a cerca de 300;

e

o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado é 10 ou menos.

[0093] O conjugado aqui descrito pode incluir um ou mais dos seguintes recursos: Por exemplo, na Fórmula (I), m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 120 (por exemplo, cerca de 1-90) e/ou m_3 é um número inteiro de 1 a cerca de 10 (por exemplo, cerca de 1-8).

[0094] Por exemplo, quando o PHF na Fórmula (I) tem um peso molecular que varia de cerca de 6 kDa a cerca de 20 kDa (ou seja, a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 variando de 45 a cerca de 150), m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 20, m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 9, m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 10 e/ou m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 75 (por exemplo, m_1 sendo cerca de 4-45)

[0095] Por exemplo, quando o PHF na Fórmula (I) tem um peso molecular que varia de cerca de 8 kDa a cerca de 15 kDa (ou seja, a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 variando de 60 a cerca de 110), m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 15, m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 7, m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 10 e/ou m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 55 (por exemplo, m_1 sendo cerca de 4-30).

[0096] Por exemplo, quando o PHF na Fórmula (I) tem um peso molecular que varia de cerca de 2 kDa a cerca de 20 kDa (ou seja, a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 variando de cerca de 15 a cerca de 150), m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 20, m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 10 (por exemplo, m_3 varia de 0 a cerca de 9), m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 8, e/ou m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 70, e o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 8 (por exemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8).

[0097] Por exemplo, o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 6 (por exemplo, cerca de 2, 3, 4, 5 ou 6).

[0098] Por exemplo, o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 6 (por exemplo, cerca de 3, 4, 5 ou 6).

[0099] Por exemplo, o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 5 (por exemplo, cerca de 3, 4, ou 5).

[00100] Por exemplo, o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 4 (por exemplo, cerca de 2, 3 ou 4).

[00101] Por exemplo, o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 4 (por exemplo, cerca de 3 ou 4).

[00102] Por exemplo, quando o PHF na Fórmula (I) tem um peso molecular que varia de cerca de 3 kDa a cerca de 15 kDa (ou seja, a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 variando de cerca de 20 a cerca de 110), m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 15, m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 8 (por exemplo, m_3 varia de 0 a cerca de 7), m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 8, e/ou m_1 é um número inteiro de 2 a

cerca de 50, e o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 8 (por exemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8).

[00103] Por exemplo, quando o PHF na Fórmula (I) tem um peso molecular que varia de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa (ou seja, a soma de m , m_1 , m_2 , m_3 , e m_4 varia de cerca de 40 a cerca de 75), m_2 é um número inteiro de cerca de 2 a cerca de 10 (por exemplo, m_2 sendo de cerca de 3-10), m_3 é um número inteiro de 0 a cerca de 5 (por exemplo, m_3 varia de 0 a cerca de 4), m_4 é um número inteiro de 1 a cerca de 8 (por exemplo, m_4 varia de 1 a cerca de 5) e/ou m_1 é um número inteiro de cerca de 2 a cerca de 35 (por exemplo, m_1 é cerca de 5-35) e o número total de L^{P2} conectado ao anticorpo isolado varia de cerca de 2 a cerca de 8 (por exemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8).

[00104] Por exemplo, cada ocorrência de D independentemente é um agente terapêutico, por exemplo, tendo um peso molecular de ≤ 5 kDa.

[00105] Por exemplo, cada ocorrência de D independentemente é um agente de diagnóstico ou uma etiqueta.

[00106] Por exemplo, algumas ocorrências de D são independentemente agentes terapêuticos (por exemplo, tendo um peso molecular de ≤ 5 kDa) e as outras ocorrências de D são agentes de diagnóstico ou etiquetas.

[00107] Por exemplo, cada ocorrência de D independentemente é um fármaco anticâncer, por exemplo, selecionado a partir de alcaloides da vinca, auristatinas, tubulisinas, duocarmicinas, compostos de camptotecina não naturais, maitansinoides, compostos de caliqueamicina, inibidores da topoisomerase, pirrolbenzodiazepinas, fármacos de ligação ao DNA, fármacos alquilantes de DNA, inibidores de RNA polimerase, inibidores de quinase, inibidores de MEK, inibidores de KSP e seus análogos.

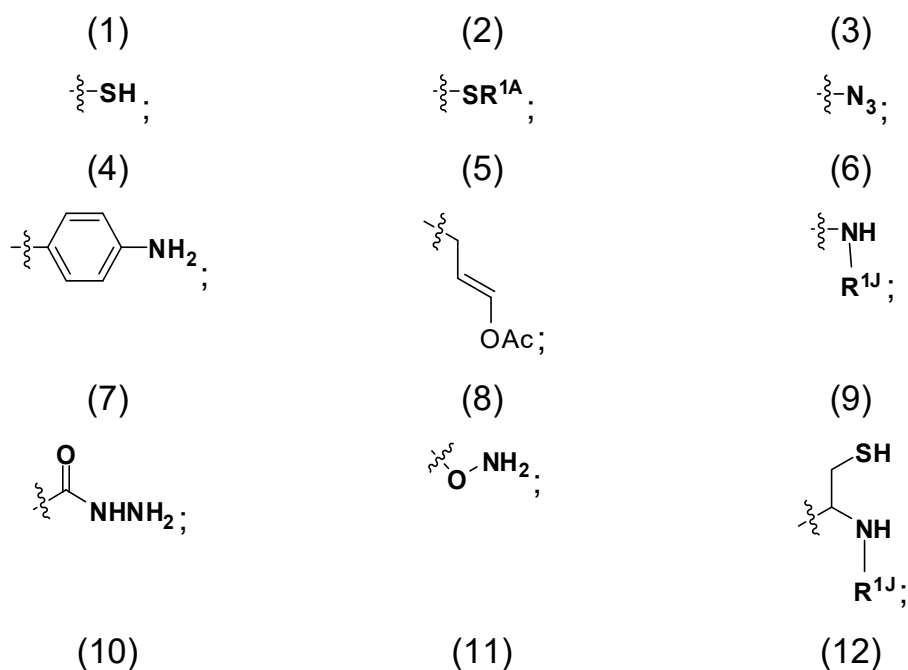
[00108] Por exemplo, cada ocorrência do composto de auristatina é auristatina, dolastatina (por exemplo, dolastatina 10 ou dolastatina 15), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), auristatina F hidroxipropil amida (AF HPA), monometilauristatina F hidroxipropilamida (AF) HPA), ou auristatina F fenilenodiamina (AFP).

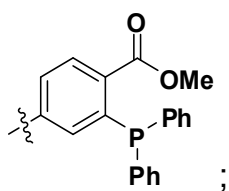
[00109] Por exemplo, cada ocorrência da duocarmicina ou análogo da mesma é duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, CC-1065, adozelesina, bizelesina ou carzelesina.

[00110] Por exemplo, cada ocorrência do composto de camptotecina é camptotecina, CPT-11 (irinotecano), SN-38 ou topotecano.

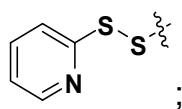
[00111] Por exemplo, cada ocorrência do composto de pirrolbenzodiazepina é um monômero de pirrolbenzodiazepina, um dímero simétrico de pirrolbenzodiazepina ou um dímero assimétrico de pirrolbenzodiazepina.

[00112] Por exemplo, cada $\text{---L}^{D1}\text{---}\left\{\text{---L}^{P2}\right\}$ quando não está conectado ao anticorpo isolado, compreende independentemente um grupo terminal W^P , no qual cada W^P é independentemente:

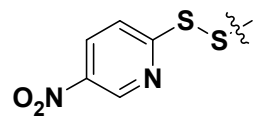




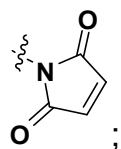
(13)



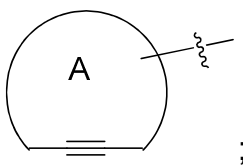
(14)



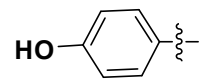
(15)



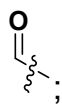
(16)



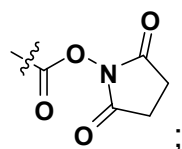
(17)



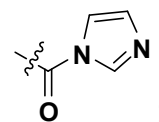
(18)



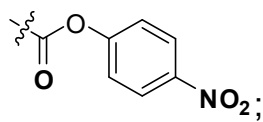
(19)



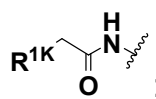
(20)



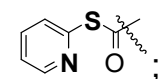
(21)



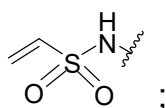
(22)



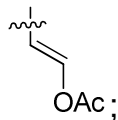
(23)



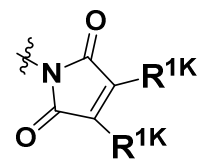
(24)



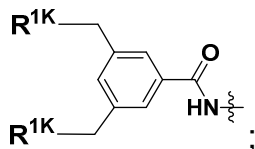
(25)



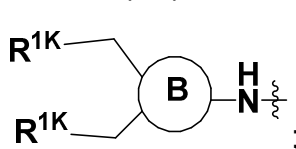
(26)



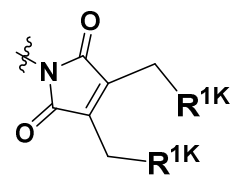
(27)



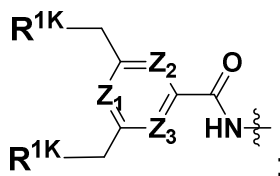
(28)



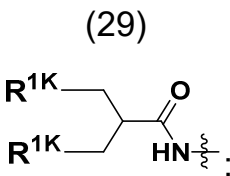
(29)



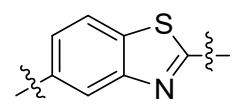
(30)



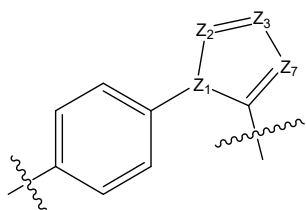
(31)



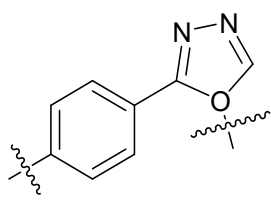
(32)



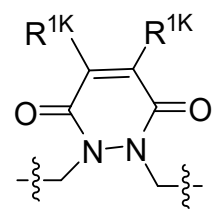
(33)



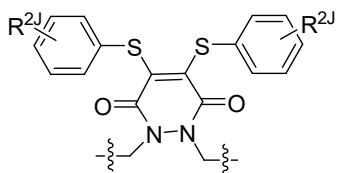
(34)



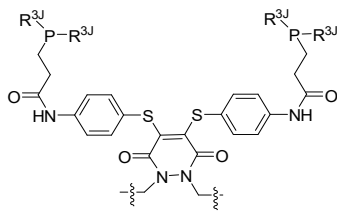
(35)



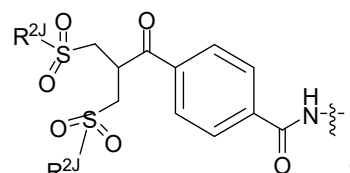
(36)



(37)

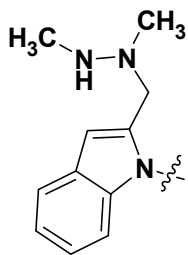


(38)

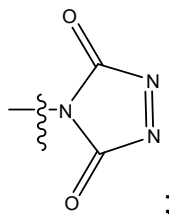


ou

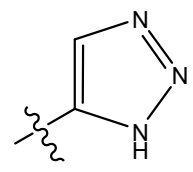
(39)



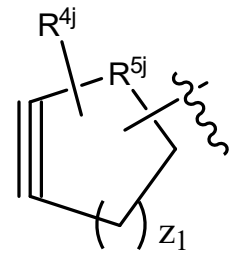
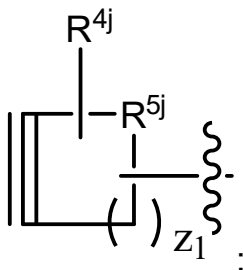
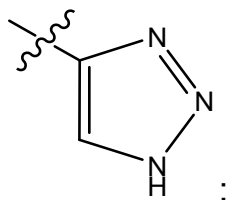
(40)



(41)



(43)



em que a

o anel A é cicloalquila ou heterocicloalquila;

o anel B é cicloalquila, heterocicloalquila, arila ou heteroarila;

R^{1K} é um grupo de saída;R^{1A} é um grupo protetor de enxofre;R^{1J} é hidrogênio, uma porção alifática, heteroalifática, carbocíclica ou de heterocicloalquila;R^{2J} é hidrogênio, uma porção alifática, arila, heteroalifática ou carbocíclica;

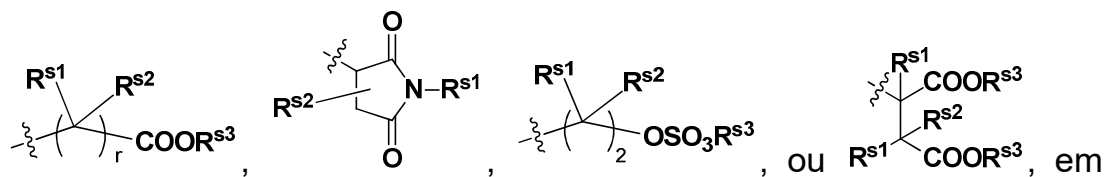
R^{3j} é alquila C_{1-6} e cada um de Z_1 , Z_2 , Z_3 e Z_7 é independentemente um átomo de carbono ou nitrogênio;

R^{4j} é hidrogênio, halogênio, OR, $-NO_2$, $-CN$, $-S(O)_2R$, alquila C_{1-24} (por exemplo, alquila C_{1-6}), ou arila ou heteroarila com 6 a 24 membros, em que o alquila C_{1-24} (por exemplo, alquila C_{1-6}), ou arila ou heteroarila de 6 a 24 membros, é opcionalmente substituído por um ou mais arila ou heteroarila; ou dois R^{4j} juntos formam um cicloalquila, heterocicloalquila, arila ou heteroarila anelados; R é hidrogênio, alquila, heteroalquila, cicloalquila ou heterocicloalquila;

R^{5j} é $C(R^{4j})_2$, O, S ou NR; e

z_1 é um número inteiro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

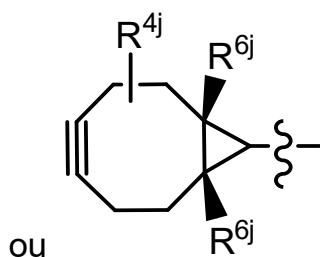
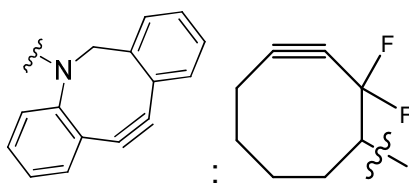
[00113] Por exemplo, cada R^{1A} é independentemente

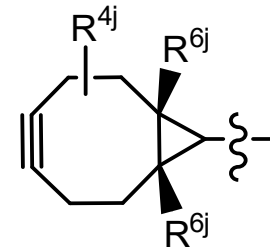


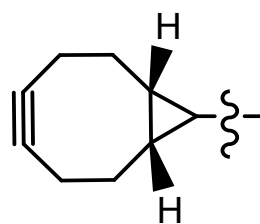
que r é 1 ou 2 e cada um de R^{s1} , R^{s2} , e R^{s3} é hidrogênio, uma porção

alifática, heteroalifática, carbocíclica ou heterocicloalquila. 

[00114] Por exemplo, o anel A pode ser

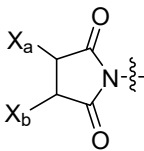


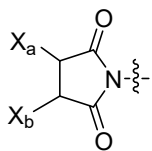
ou ; em que R^{6j} é hidrogênio, halogênio, alquila C_{1-24} (por exemplo, alquila C_{1-6}) ou arila ou heteroarila com 6 a 24 membros, em que o alquila C_{1-24} (por exemplo, alquila C_{1-6}) ou arila com 6 a 24 membros ou heteroarila, é opcionalmente substituído por um ou mais arila ou heteroarila.



[00115] Por exemplo, o anel A pode ser

[00116] Por exemplo, o grupo funcional de L^{P2} que ainda está para formar uma ligação covalente com um grupo funcional do anticorpo isolado (como um grupo funcional ou uma porção reativa em um resíduo de aminoácido do anticorpo, por exemplo, um grupo funcional em um resíduo de cisteína ou um resíduo de lisina do anticorpo), é selecionado dentre

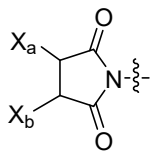
$-\text{SR}^p$, $-\text{SS-LG}$,  e halo, em que LG é um grupo de saída, R^p é H ou um grupo protetor de enxofre, e um de X_a e X_b é H e o outro é uma porção bloqueadora de maleimido solúvel em água, ou X_a e X_b , juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados para uma ligação dupla carbono-carbono. Por exemplo, o grupo funcional de L^{P2} que ainda está para formar uma ligação covalente é um grupo funcional que não reage com um grupo funcional do anticorpo isolado,

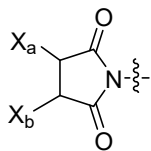
por exemplo,  como o grupo funcional de L^{P2} , no qual um de X_a e X_b é H e o outro é uma porção bloqueadora de maleimido solúvel em água, ou X_a e X_b .

[00117] Por exemplo, L^{D1} compreende $-\text{X}-(\text{CH}_2)_v-\text{C}(=\text{O})-$ com X diretamente conectado ao grupo carbonila de $-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^{D1}-\xi-$, no qual X é CH_2 , O ou NH, e v é um número inteiro de 1 a 6.

[00118] Por exemplo, cada ocorrência de $-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^{D1}-\xi-\text{L}^{P2}$ é independentemente $-\text{C}(=\text{O})-\text{X}-(\text{CH}_2)_v-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$

$(\text{CH}_2)_w-(\text{OCH}_2)_x-\text{NHC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_y-\text{M}$, em que X é CH_2 , O ou NH, cada um de v, u, w, x e y é independentemente um número inteiro de 1 a 6,



e M é , em que um de X_a e X_b é H e o outro é uma porção bloqueadora de maleimido solúvel em água, ou X_a e X_b, juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados para uma ligação dupla carbono-carbono.

[00119] Por exemplo, cada um de v, u, w, x e y é 2.

[00120] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ou 1:1.

[00121] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2:1 ou 1:1.

[00122] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 ou 10:1

[00123] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 ou 11:1.

[00124] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 15:1, 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00125] -Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00126] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 13:1 ou 12:1.

[00127] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 12:1.

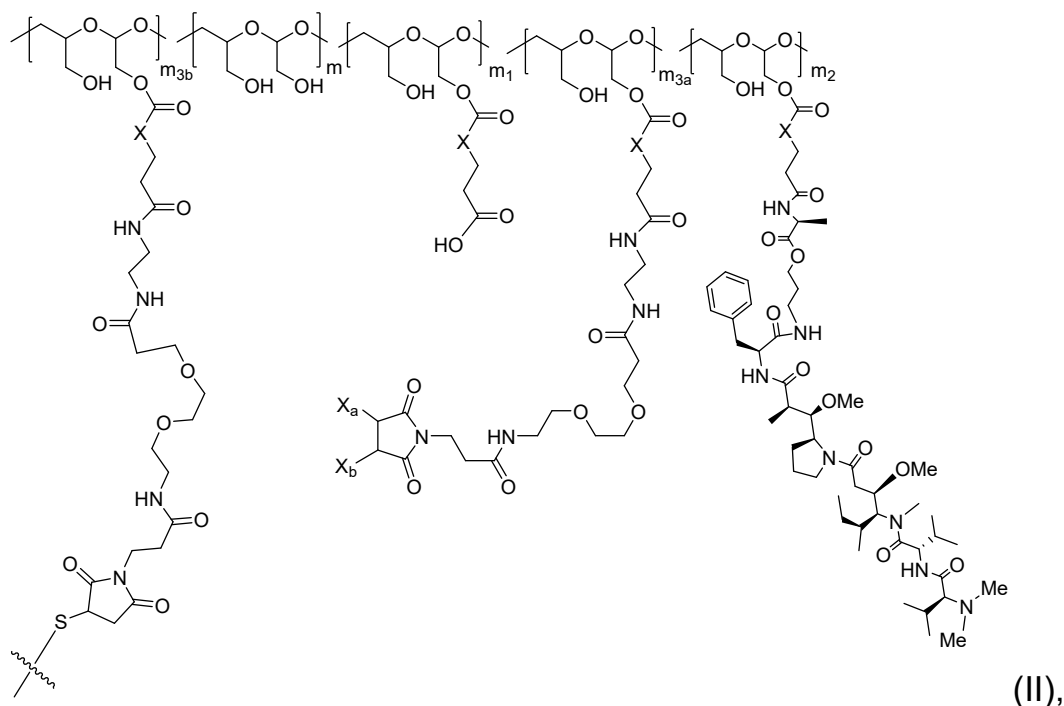
[00128] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00129] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00130] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00131] Por exemplo, a razão entre D e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é de cerca de 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00132] Por exemplo, cada uma das uma ou mais estruturas poliméricas independentemente portadoras de D é de Fórmula (II):



em que:

m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, e

o terminal $\text{---}\xi\text{---}$ denota a união direta da uma ou mais estruturas

poliméricas ao anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535. A estrutura da Fórmula (II) pode incluir um ou mais dos seguin-

tes recursos:

[00133] A soma de m_{3a} e m_{3b} está entre 1 e 18.

[00134] Quando o PHF na Fórmula (II) tem um peso molecular que varia de cerca de 2 kDa a cerca de 40 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 15 a cerca de 300, m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140, m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 17, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a 18, e a razão entre o PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, são 10 ou menos.

[00135] Quando o PHF na Fórmula (II) tem um peso molecular variando de cerca de 2 kDa a cerca de 20 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 15 a cerca de 150, m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 70, m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 20, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 9, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a cerca de 10, e a razão entre o PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é um número inteiro de 2 a cerca de 8 (por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 6 ou de cerca de 2 a cerca de 4).

[00136] Quando o PHF na Fórmula (II) tem um peso molecular variando de cerca de 3 kDa a cerca de 15 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 20 a cerca de 110, m_1 é um número inteiro de 2 a cerca de 50, m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 15, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 7, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a cerca de 8; e a razão entre o PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é um número inteiro de 2 a cerca de 8 (por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 6 ou de cerca de 2 a cerca de 4).

[00137] Quando o PHF na Fórmula (II) tem um peso molecular variando de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a}

e m_{3b} varia de cerca de 40 a cerca de 75, m_1 é um número inteiro de 2 a cerca de 35, m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 10, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 4, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 5, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a cerca de 5; e a razão entre o PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, é um número inteiro de 2 a cerca de 8 (por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 6 ou de cerca de 2 a cerca de 4).

[00138] Em certas modalidades, a razão entre a auristatina F hidroxipropilamida ("AF HPA") e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, pode ser de cerca de 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00139] Em certas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, pode ser de cerca de 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00140] Em outras modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535, pode ser de cerca de 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00141] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 ou 10:1.

[00142] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 ou 11:1.

[00143] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 15:1, 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00144] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-

corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00145] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 13:1 ou 12:1.

[00146] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 12:1.

[00147] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00148] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00149] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00150] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anti-corpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00151] Em certas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ou 1:1.

[00152] Em certas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 ou 2:1.

[00153] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ou 1:1.

[00154] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1, 3:1

ou 2:1.

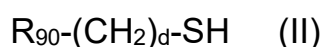
[00155] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1 ou 3:1.

[00156] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 5:1, 4:1 ou 3:1.

[00157] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 4:1, 3:1 ou 2:1.

[00158] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado pode ser de cerca de 4:1 ou 3:1.

[00159] As porções bloqueadoras de maleimido solúvel em água (por exemplo, X_a ou X_b) são porções que podem ser unidas covalentemente a um dos dois átomos de carbono de olefina após a reação do grupo maleimido com um composto de fórmula (II) contendo tiol:



em que:

R_{90} é NHR_{91} , OH, $COOR_{93}$, $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ ou um grupo fenil substituído;

R_{93} é hidrogênio ou alquila C_{1-4} ;

R_{91} é hidrogênio, CH_3 ou CH_3CO e

d é um número inteiro de 1 a 3.

[00160] Em uma modalidade, o composto bloqueador de maleimido solúvel em água da Fórmula (II) pode ser cisteína, N-aceticisteína, éster metílico de cisteína, N-metilcisteína, 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropanoico, ácido 2-mercaptoacético, mercaptometanol (isto é, $HOCH_2SH$), benziltiol no qual fenil é substituído por um ou mais substituintes hidrofílicos ou 3-aminopropano-1-tiol. Os um ou mais substituintes hidrofílicos no fenil compreendem OH, SH, metoxi, etoxi, $COOH$, CHO , CO alquila C_{1-4} , NH_2 , F, ciano, SO_3H , PO_3H e semelhantes.

[00161] Em outro aspecto, o grupo bloqueador de maleimido solúvel em água é $-S-(CH_2)_d-R_{90}$, no qual,

R_{90} é OH, COOH, ou $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

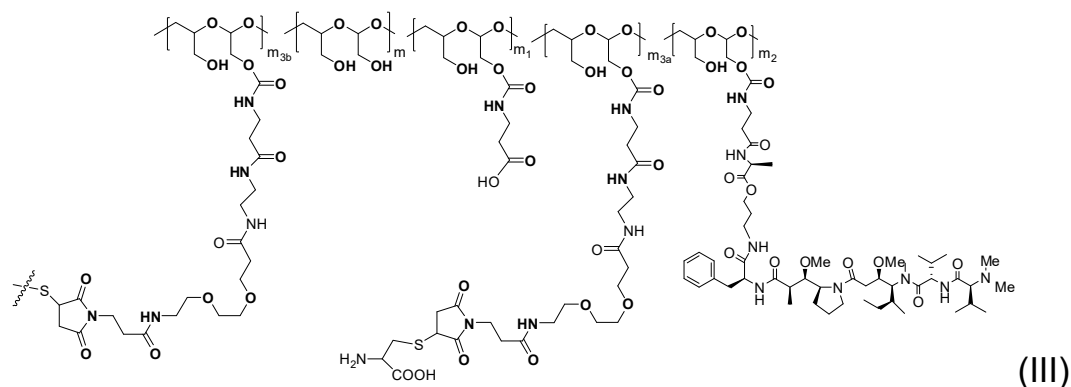
R_{93} é hidrogênio ou CH_3 ;

R_{91} é hidrogênio ou CH_3CO ; e

d é 1 ou 2.

[00162] Em outra modalidade, o grupo bloqueador de maleimido solúvel em água é $-S-CH_2-CH(NH_2)COOH$.

[00163] Em certas modalidades, o conjugado aqui descrito compreende um ou mais PHF portador de D, cada um dos quais independentemente é da Fórmula (III), em que o PHF tem um peso molecular que varia de cerca de 2 kDa a cerca de 40 kDa:



em que:

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,

m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,

m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,

m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8;

a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 18;

a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , e m_{3b} varia de cerca de 15 a cerca de 300;

o terminal ξ indica a união de um ou mais estruturas poliméricas de PHF ao anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-

1535,

a razão entre o PHF e o anticorpo é 10 ou menos.

[00164] A estrutura da Fórmula (III) pode incluir um ou mais dos seguintes recursos:

[00165] Quando o PHF na Fórmula (III) tem um peso molecular que varia de cerca de 2 kDa a cerca de 20 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 15 a cerca de 150, m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 70, m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 20, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 9, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a 10, e a razão entre o PHF e o anticorpo é um número inteiro de 2 a cerca de 8.

[00166] Quando o PHF na Fórmula (III) tem um peso molecular variando de cerca de 3 kDa a cerca de 15 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 20 a cerca de 110, m_1 é um número inteiro de 2 a cerca de 50, m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 15, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 7, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a cerca de 8; e a razão entre o PHF e o anticorpo é um número inteiro de 2 a cerca de 8 (por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 6 ou de cerca de 2 a cerca de 4).

[00167] Quando o PHF na Fórmula (III) tem um peso molecular variando de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa, a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} e m_{3b} varia de cerca de 40 a cerca de 75, m_1 é um número inteiro de 2 a cerca de 35, m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 10, m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 4, m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 5, a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 a cerca de 5; e a razão entre o PHF e o anticorpo é um número inteiro de 2 a cerca de 8 (por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 6 ou de cerca de 2 a cerca de 4).

[00168] Em certas modalidades, a razão entre a auristatina F hidroxipropilamida ("AF HPA") e o anticorpo pode ser de cerca de 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1,

17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00169] Em certas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00170] Em outras modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 ou 6:1.

[00171] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 ou 10:1.

[00172] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 ou 11:1.

[00173] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 15:1, 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00174] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 14:1, 13:1 ou 12:1.

[00175] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 13:1 ou 12:1.

[00176] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 12:1.

[00177] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00178] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00179] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 12:1, 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00180] Em algumas modalidades, a razão entre AF HPA e o anticorpo pode ser de cerca de 11:1, 10:1 ou 9:1.

[00181] Em certas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ou 1:1.

[00182] Em certas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo

pode ser de cerca de 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 ou 2:1.

[00183] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ou 1:1.

[00184] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 ou 2:1.

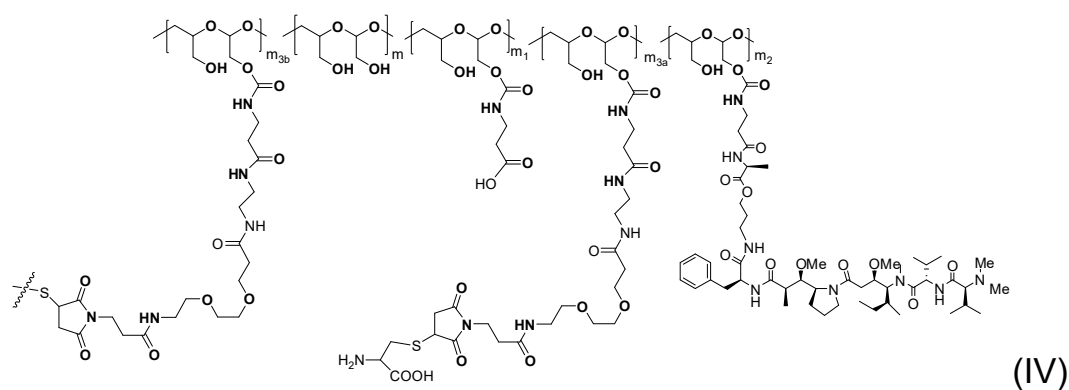
[00185] Em outras modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 6:1, 5:1, 4:1 ou 3:1.

[00186] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 5:1, 4:1 ou 3:1.

[00187] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 4:1, 3:1 ou 2:1.

[00188] Em algumas modalidades, a razão entre PHF e o anticorpo pode ser de cerca de 4:1 ou 3:1.

[00189] Em certas modalidades, no conjugado aqui descrito, a estrutura polimérica portadora de D da Fórmula (III) é da Fórmula (IV), em que o polímero é PHF que tem um peso molecular que varia de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa:



em que:

m é um número inteiro de 30 a cerca de 35,

m_1 é um número inteiro de 8 a cerca de 10,

m_2 é um número inteiro de 2 a cerca de 5,

m_{3a} é um número inteiro de 0 a cerca de 1,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 2;

a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 4;

o terminal $\text{---}\xi\text{---}$ indica a união de um ou mais estruturas poliméricas de PHF ao anticorpo direcionado ao NaPi2b isolado, XMT-1535,

a razão entre o PHF e o anticorpo é de cerca de 3 a cerca de 5.

Métodos de diagnóstico, preditivos e prognósticos da invenção

[00190] Em vários aspectos, a invenção fornece um método para identificar um paciente com câncer passível de terapia direcionada ao NaPi2b medindo o status da expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente e identificar o paciente para tratamento com base na expressão de NaPi2b na amostra de tumor.

[00191] Especificamente, a invenção fornece métodos de discriminação entre pacientes com câncer que responderão ao tratamento direcionado ao NaPi2b, por exemplo, tratamento com o conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b descrito em WO2017/160754 daqueles que não responderão com base nos níveis de expressão de NaPi2b. O perfila de expressão de NaPi2b se correlaciona com (e é capaz de discriminar entre) pacientes com resposta boa ou ruim ao tratamento.

[00192] Em outras modalidades, a invenção inclui um método para comparar a expressão de NaPi2b em uma amostra de células cancerígenas de um paciente com um perfila de NaPi2b de controle para determinar o provável resultado clínico ou de tratamento para o paciente ou resultado biológico natural. Essas modalidades da invenção podem ser vantajosamente usadas para atender a uma importante necessidade diagnóstica não atendida da capacidade de prever se um paciente provavelmente se beneficiará de um determinado tipo de tratamento ou se um paciente estará melhor com outro tipo de tratamento. Por exemplo, um valor alto do nível de expressão de NaPi2b pode estar fortemente associado à resposta aos conjugados de fármaco-anticorpo

polimérico direcionado ao NaPi2b descritos em WO 2017/160574.

[00193] Os métodos da invenção fornecem padrões de expressão de proteínas objetivos, que podem ser usados sozinhos ou em combinação com critérios subjetivos para fornecer uma avaliação mais precisa dos resultados do paciente, incluindo a sobrevivência e a recorrência do câncer.

[00194] Em vários aspectos, a invenção forneceu um método para identificar e/ou tratar doenças ou distúrbios relacionados à expressão de NaPi2b aberrante medindo a expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente.

[00195] Os métodos da invenção fornecem padrões de expressão de proteínas objetivos, que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com critérios subjetivos para fornecer um diagnóstico mais preciso de NSCLC. Por exemplo, a invenção fornece métodos para diagnosticar NSCLC em um paciente medindo a expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente. Especificamente, a invenção fornece métodos para subtipar um NSCLC medindo a expressão de NaPi2b na amostra de tumor obtida do paciente e identificando o NSCLC como sendo adenocarcinoma com base na expressão de NaPi2b na amostra de tumor. Opcionalmente, os níveis de expressão de um ou mais TTF-1, Napsina A, p63, p40 ou CH5/6 são posteriormente determinados.

[00196] O paciente com câncer tem uma doença ou distúrbios relacionados à atividade e/ou expressão de NaPi2b aberrante. Doenças ou distúrbios relacionados à atividade e/ou expressão de NaPi2b aberrante incluem, mas não estão limitados a, câncer. O câncer pode ser câncer de ovário, como câncer de ovário epitelial, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), como NSCLC não escamoso, câncer de mama, câncer de rim, carcinoma do ducto salivar, câncer de tireoide papilar,

câncer renal papilar, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial e colangiocarcinoma.

[00197] O indivíduo é refratário à quimioterapia, incluindo agentes quimioterapêuticos padrão de primeira linha. Em algumas modalidades, o indivíduo tem câncer de ovário sensível à platina. Em algumas modalidades, o indivíduo tem câncer de ovário refratário à platina. Em algumas modalidades, o indivíduo tem câncer de ovário avançado e não recebeu nenhuma terapia anterior para o tratamento de câncer (por exemplo, câncer de ovário). Em algumas modalidades, o indivíduo tem câncer de ovário avançado e não recebeu quimioterapia anterior para tratamento de câncer (por exemplo, câncer de ovário).

[00198] A amostra é derivada de um indivíduo com ou com suspeita de câncer. A amostra de células cancerígenas é dissecada do tecido removido ou obtido do indivíduo.

[00199] Em algumas modalidades, a população de células de teste é derivada de tecido fresco e não congelado de uma amostra de biópsia. Em outras modalidades, a população de células de teste é derivada de um sítio primário ou metastático. Em algumas modalidades, a população de células de teste é derivada de um tecido fresco ou congelado de uma amostra de biópsia ou cirúrgica ou fluido ascítico ou fluido pleural. Em algumas modalidades, a população de células de teste é derivada de um tecido fixado (por exemplo, fixação de formalina ou embebido em parafina fixado em formalina (FFPE)) de uma amostra de biópsia ou cirúrgica ou bloco celular derivado de um espécime de fluido. A amostra de tecido pode estar congelada ou fresca.

[00200] A terapia direcionada ao NaPi2b inclui terapia de fármaco-anticorpo (ADC) direcionado ao NaPi2b. Por exemplo, essa terapia de conjugado de fármaco-anticorpo (ADC) direcionado ao NaPi2b, conforme descrito em WO 2017/160754.

[00201] O nível requerido de expressão de NaPi2b pode ser aquele

que é identificado pelos métodos conhecidos na técnica e, mais especificamente, pelos métodos aqui descritos.

[00202] Por exemplo, o nível de expressão de NaPi2b pode ser medido através da realização de um ensaio imunológico conhecido, como um imunoenensaio enzimático, radioimunensaio, imunensaio competitivo, ensaio do tipo sanduíche de anticorpo duplo, ensaio imunoenzimático, fluoroimunensaio, ELISA, técnica Western blotting, ensaio de aglutinação, citofluorometria (por exemplo, citometria de fluxo) ou ensaio de coloração imuno-histoquímica, usando um anticorpo que reconhece especificamente NaPi2b (por exemplo, os anticorpos quiméricos de acordo com a invenção). Ensaio baseado em células, tais como citometria de fluxo (FC), imuno-histoquímica (IHC) ou imunofluorescência (IF) são particularmente desejáveis na prática dos métodos da invenção, uma vez que esses formatos de ensaio são clinicamente adequados. Por conseguinte, em algumas modalidades, os métodos da invenção são implementados em um formato de ensaio de citometria de fluxo (FC), imuno-histoquímica (IHC) ou imunofluorescência (IF). Preferencialmente, os métodos são implementados no formato IHC.

[00203] A citometria de fluxo (FC) pode ser empregada para determinar a expressão de NaPi2b na superfície celular em uma amostra de tumor antes, durante e após o tratamento com um fármaco direcionado à inibição da expressão de NaPi2b. Por exemplo, as células tumorais podem ser analisadas por citometria de fluxo para NaPi2b, bem como para marcadores que identificam os tipos de células cancerígenas, etc., se desejado. A citometria de fluxo pode ser realizada de acordo com métodos padrão. Ver, por exemplo, Chow et al., Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 46: 72-78 (2001). Resumidamente e a título de exemplo, o seguinte protocolo para análise citométrica pode ser empregado: fixação das células com paraformaldeído a

2% por 10 minutos a 37°C, seguido de permeabilização em 90% de metanol por 30 minutos em gelo. As células podem então ser coradas com anticorpo específico para NaPi2b, lavadas e etiquetadas com um anticorpo secundário etiquetado fluorescentemente. As células seriam então analisadas em um citômetro de fluxo (por exemplo, um Beckman Coulter FC500) de acordo com os protocolos específicos do instrumento utilizado. Tal análise identificaria o nível de NaPi2b expresso no tumor.

[00204] A coloração imuno-histoquímica (IHC) também pode ser empregada para determinar a expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor antes, durante e após o tratamento com um fármaco direcionado à inibição da atividade. O IHC pode ser realizado de acordo com técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, Chapter 10, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Resumidamente, e a título de exemplo, o tecido embebido em parafina (por exemplo, tecido tumoral de uma biópsia) é preparado para coloração imuno-histoquímica por desparafinização de seções de tecido com xileno seguido de etanol; hidratação em água e depois PBS; desmascarar o antígeno aquecendo a lâmina em tampão de citrato de sódio; incubar seções em peróxido de hidrogênio; bloquear em solução de bloqueio; incubar a lâmina no anticorpo polipeptídico primário e no anticorpo secundário; e finalmente detectar usando o método de avidina/biotina ABC de acordo com as instruções do fabricante.

[00205] Os ensaios de imunofluorescência (IF) também podem ser empregados para determinar a expressão da amostra de tumor de NaPi2b antes, durante e após o tratamento com um fármaco direcionado à inibição da atividade. O IF pode ser realizado de acordo com técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, J. M. Polak e S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 2ª Ed.;

ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37, BioScientific/Springer-Verlag. Resumidamente, e a título de exemplo, as amostras de pacientes podem ser fixadas em paraformaldeído seguido de metanol, bloqueadas com uma solução de bloqueio, como soro de cavalo, incubadas com o anticorpo primário contra o polipeptídeo, seguido de um anticorpo secundário etiquetado com um corante fluorescente como Alexa 488 e analisado com um microscópio epifluorescente.

[00206] Os anticorpos empregados nos ensaios descritos acima podem ser vantajosamente conjugados a corantes fluorescentes (por exemplo, Alexa488, PE) ou outras etiquetas, como pontos quânticos, para uso em análises multiparamétricas juntamente com outra transdução de sinal (fosfo-AKT, fosfo-Erk 1/2) e/ou anticorpos de marcadores celulares (citoqueratina).

[00207] Em uma modalidade preferida, a expressão de NaPi2b em uma amostra de um tumor é determinada imuno-histoquimicamente. Em uma modalidade ainda mais preferida, a expressão de NaPi2b em uma amostra de um tumor é determinada imuno-histoquimicamente (IHC) usando o anticorpo quimérico aqui descrito.

[00208] Alternativamente, o ensaio pode incluir a preparação de RNA da amostra, opcionalmente para uso em PCR (reação em cadeia da polimerase) ou outra metodologia analítica. A metodologia de PCR é opcionalmente, por exemplo, RT-PCR (PCR de transcrição reversa) ou PCR quantitativa, como, por exemplo, RT-PCR em tempo real, RNAseq e similares. Alternativamente, o teste pode ser realizado pelo uso de uma matriz, tal como um microarranjo conhecido no campo relevante.

[00209] Os pacientes são identificados como responsivos ao tratamento, em que o tratamento é monitorado ou o câncer é detectado detectando e/ou medindo o nível de expressão de NaPi2b em uma amos-

tra.

[00210] A detecção/medição do nível de expressão de NaPi2b é determinada calculando um escore de NaPi2b. O escore de NaPi2b é quantitativo ou semiquantitativo. Por exemplo, a detecção é pontuada patologicamente para chegar a um escore patológico. Está contemplado que quaisquer métodos de escore conhecidos na técnica podem ser utilizados nos métodos da invenção. Em particular, quaisquer métodos de escore histológico conhecidos na técnica.

[00211] Os métodos para avaliar os resultados da medição obtidos por ensaios de coloração imuno-histoquímica incluem, por exemplo, o método de escore H. O escore H é determinado pela seguinte fórmula de cálculo (Am J Clin Pathol. 1988; 90 (3): 233-9).
$$\text{Escore H} = ((\% \text{ a } <1+) \times 0) + ((\% \text{ a } 1+) \times 1) + ((\% \text{ a } 2+) \times 2) + ((\% \text{ a } 3+) \times 3)$$
 em que a intensidade da coloração 0 é não corada; a intensidade da coloração 1 é coloração fraca; a intensidade de coloração 2 é coloração moderada; e a intensidade da coloração 3 é coloração forte.

[00212] Em algumas modalidades, o escore H pode ser um valor de 0 a 300 e, quando o escore H é maior que um ponto de corte, efeitos antitumorais podem ser observados em quimioterapia que usa o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b de presente invenção. Por exemplo, quando o indivíduo tem um escore H de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 ou superior, o indivíduo responde ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b (ADC), conforme descrito aqui e em WO 2017/160754

[00213] Na avaliação pelo método do escore H, apenas porções de células cancerígenas são usadas. Para controles negativos ou positivos para intensidade de coloração, podem ser usadas linhas celulares ou xenoinxertos embebidos em parafina fixados em formalina (linhas cujos níveis de expressão de proteínas são conhecidos antecipadamente). Quando não há amostras de controle, uma pluralidade de

amostras é avaliada simultaneamente para confirmar a distribuição geral da intensidade de coloração das amostras e, em seguida, a intensidade de coloração pode ser definida.

[00214] Além do método de escore H, outros métodos de escore, como o método Allred (Harvey, et al. Journal of Clinical Oncology 17, no. 5 (May 1999) 1474-1474), também podem ser usados. É necessário definir pontos de corte em cada método. Escore Allred = escore da porcentagem de células positivas + escore de intensidade da coloração. Os espécimes também podem ser pontuados semiquantitativamente como tendo um escore de 1+ ou 2+ ou 3+ para a expressão de NaPi2b.

Medições de desempenho e precisão da invenção

[00215] O desempenho e, portanto, a utilidade clínica absoluta e relativa da invenção pode ser avaliado de várias maneiras, como observado acima. Entre as várias avaliações de desempenho, a invenção pretende fornecer precisão no diagnóstico e prognóstico clínico. A precisão de um teste, ensaio ou método diagnóstico, preditivo ou prognóstico, diz respeito à capacidade do teste, ensaio ou método de distinguir entre os indivíduos responsivos ao tratamento quimioterapêutico e os que não são, com base no fato de os indivíduos terem uma "quantidade efetiva" ou "alteração significativa" nos níveis de NaPi2b. Por "quantidade efetiva" ou "alteração significativa", entende-se que a medição NaPi2b é diferente do ponto de corte predeterminado (ou valor limite) e, portanto, indica que a capacidade de resposta do indivíduo à terapia ou sobrevida global/livre da doença para a qual o NaPi2b é um determinante.

[00216] No diagnóstico categórico de um estado patológico, alterar o ponto de corte ou o valor limite de um teste (ou ensaio) geralmente altera a sensibilidade e a especificidade, mas em uma relação qualitativamente inversa. Portanto, ao avaliar a precisão e a utilidade de um

teste, ensaio ou método médico proposto para avaliar a condição de um indivíduo, deve-se sempre levar em consideração a sensibilidade e a especificidade e estar atento ao ponto de corte em que a sensibilidade e a especificidade são relatadas porque a sensibilidade e a especificidade podem variar significativamente no intervalo de pontos de corte.

Construção de Algoritmos Clínicos

[00217] Qualquer fórmula pode ser usada para combinar resultados de NaPi2b em índices úteis na prática da invenção. Como indicado acima, e sem limitação, esses índices podem indicar, entre as várias outras indicações, a probabilidade, verossimilhança, chance absoluta ou relativa de responder a, por exemplo, quimioterapia ou quimiorradioterapia, isto é, terapia direcionada ao NaPi2b, por exemplo tratamento com o conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b aqui descrito e divulgado em WO 2017/160754. Isso pode ser por uma previsão ou período de tempo específico, ou pelo risco da vida restante, ou simplesmente ser fornecido como um índice relativo a outra população de indivíduos de referência.

[00218] Embora várias fórmulas preferidas sejam descritas aqui, vários outros modelos e tipos de fórmulas além daqueles mencionados aqui e nas definições acima são bem conhecidos dos especialistas na técnica. O tipo ou a fórmula do modelo real usado pode ser ele próprio selecionado no campo de modelos em potencial com base nas características de desempenho e precisão do diagnóstico de seus resultados em uma população de treinamento. As especificidades da fórmula em si podem comumente ser derivadas de resultados de NaPi2b na população de treinamento relevante. Entre outros usos, essa fórmula pode ter como objetivo mapear o espaço de recurso derivado de uma ou mais entradas a um conjunto de classes de indivíduos (por exemplo, útil na previsão da associação de classes de indivíduos como

normais, respondedores e não respondedores), para obter uma estimativa de uma função de probabilidade de risco usando uma abordagem de Bayesian (por exemplo, o risco de câncer ou um evento metastático) ou para estimar as probabilidades condicionais de classe e, em seguida, usa a regra de Bayes para produzir a função de probabilidade de classe como no caso anterior.

Métodos de tratamento

[00219] Uma vez selecionado para o tratamento, o paciente recebe uma quantidade terapeuticamente eficaz de um conjugado de anticorpo de NaPi2b (por exemplo, conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b aqui descrito ou divulgado em WO 2017/160754).

[00220] Por conseguinte, a presente invenção também fornece métodos de tratamento, prevenção, atraso da progressão ou melhora de um sintoma de um câncer selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de ovário epitelial, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), como NSCLC não escamoso, adenocarcinoma, câncer de mama, câncer renal, carcinoma do ducto salivar, câncer de tireoide papilar, câncer renal papilar, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial e colangiocarcinoma através da administração de um conjugado de anticorpo de NaPi2b (por exemplo, conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b aqui descrito ou divulgado em WO 2017/160753) a um indivíduo identificado pelos métodos aqui descritos. O indivíduo a ser tratado é, por exemplo, humano. O conjugado é administrado em uma quantidade suficiente para tratar, prevenir ou aliviar um sintoma associado à patologia.

[00221] A quantidade terapeuticamente eficaz refere-se geralmente à quantidade necessária para alcançar um objetivo terapêutico. A quantidade necessária para ser administrada dependerá ainda da afi-

nidade de ligação do anticorpo para seu antígeno específico e também dependerá da taxa na qual um anticorpo administrado é esgotado do volume livre em outro indivíduo ao qual é administrado. O regime de dosagem utilizando os conjugados aqui descritos também é selecionado de acordo com uma variedade de outros fatores, incluindo tipo, espécie, idade, peso, sexo e condição médica do paciente; a gravidade da condição a ser tratada; a via de administração; a função renal e hepática do paciente; e o conjugado particular empregado. Um médico ou veterinário normalmente qualificado pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz de conjugado necessária para prevenir, conter ou interromper o progresso da doença.

[00222] As faixas comuns para dosagem terapeuticamente eficaz de um conjugado de anticorpo NaPi2b aqui descrito podem ser, a título de exemplo não limitativo, de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal ou de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 150 mg/kg de peso corporal. As faixas aqui descritas são expressas como quantidade administrada com base no peso do indivíduo, e um especialista na técnica pode expressá-lo facilmente como quantidade administrada por área de superfície corporal do indivíduo. Por exemplo, 1 mg/kg de peso corporal para um adulto humano é equivalente a cerca de 37 mg/m² e 1 mg/kg de peso corporal para uma criança humana é equivalente a cerca de 25 mg/m².

[00223] As frequências de dosagem comuns podem variar, por exemplo, de duas vezes ao dia a uma vez por mês (por exemplo, uma vez ao dia, uma vez por semana; uma vez a cada duas semanas; uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas ou mensalmente). Por exemplo, os conjugados de XMT-1535 aqui descritos podem ser administrados (por exemplo, em dose única semanal, a ca-

da 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas ou mensalmente) de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg (por exemplo, 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,67 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,67 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, ou 20 mg/kg). Por exemplo, os conjugados de XMT-1535 aqui descritos podem ser administrados (por exemplo, em dose única semanal, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas ou mensalmente) de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg (por exemplo, 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,67 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,67 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, ou 20 mg/kg) para o tratamento de câncer de ovário que expressa NaPi2b ou câncer NSCLC que expressa NaPi2b.

[00224] As frequências de dosagem comuns podem variar, por exemplo, de duas vezes ao dia a uma vez por mês (por exemplo, uma vez ao dia, uma vez por semana; uma vez a cada duas semanas; uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas ou mensalmente). Por exemplo, os conjugados de XMT-1535 aqui descritos podem ser administrados (por exemplo, em dose única semanal, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas ou mensalmente) a cerca de 3 mg/m² a cerca de 53 mg/m² (por exemplo, 3 mg/m², 6 mg/m², 12 mg/m², 20 mg/m², 25 mg/m², 30 mg/m², 35 mg/m², 40 mg/m², ou 53 mg/m²). Por exemplo, os conjugados de XMT-1535 aqui descritos podem ser administrados (por exemplo, em dose única semanal, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas ou mensalmente) a cerca de 3 mg/m² a cerca de 53 mg/m² (por exemplo, 3 mg/m², 6 mg/m², 12 mg/m², 20 mg/m², 25 mg/m², 30 mg/m², 35

mg/m², 40 mg/m², ou 53 mg/m²) para o tratamento de câncer de ovário que expressa NaPi2b ou câncer NSCLC que expressa NaPi2b.

[00225] A eficácia do tratamento é determinada em associação com qualquer método conhecido para diagnosticar ou tratar o distúrbio específico relacionado ao NaPi2b. O alívio de um ou mais sintomas do distúrbio relacionado ao NaPi2b indica que o anticorpo confere um benefício clínico.

Kits

[00226] A invenção fornece kits que compreendem os anticorpos de NaPi2b quiméricos (por exemplo, MERS67) que detectam o nível de expressão de NaPi2b em uma amostra de paciente (por exemplo, o número de antígenos por célula) e uma composição terapêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b como descrito aqui ou divulgado em WO 2017/160754. Se desejado, o kit compreende adicionalmente instruções para detectar o nível de expressão de NaPi2b e determinar se o conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b descrito em WO 2017/160754 seria eficaz ou não se administrado ao paciente. Preferencialmente, o kit é um kit de teste imunohistoquímico. Opcionalmente, o kit compreende adicionalmente instruções para administrar um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, conforme descrito aqui ou divulgado em WO 2017/160754 a um paciente selecionado para receber esse tratamento.

Definições

[00227] A menos que definido de outra forma, os termos científicos e técnicos usados em conexão com a presente descrição devem ter os significados que são comumente entendidos pelos versados na técnica. Além disso, a menos que seja exigido pelo contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e os termos plurais devem incluir

o singular. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em conexão com as técnicas de cultura de células e tecidos, biologia molecular e química e hibridação de proteínas e oligo- ou polinucleotídeos aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura e transformação de tecidos (por exemplo, eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como comumente realizado na técnica ou conforme descrito neste documento. Estas técnicas e procedimentos anteriores são geralmente executados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). As nomenclaturas utilizadas em conexão com e os procedimentos e técnicas de laboratório de química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e entrega e tratamento de pacientes.

[00228] Como utilizado de acordo com a presente descrição, os seguintes termos, salvo indicação do contrário, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

[00229] Conforme usado aqui, os termos "NaPi2b" (também conhecido como proteína de transporte de fosfato dependente de sódio 2B, SLC34A2, NaPi1b, Npt2, cotransportador de fosfato dependente de Na(+) 2B; cotransportador de sódio/fosfato 2B; cotransportador de Na(+)/Pi 2B; NaPi3b; família de transportadores de soluto 34 membro

2), quando usado no presente documento, refere-se ao NaPi2b humano (por exemplo, GenBank N° de acesso O95436.3) e inclui quaisquer variantes, isoformas e homólogos de espécies de NaPi2b que são naturalmente expressos pelas células, incluindo células tumorais ou são expressas em células transfectadas com o gene NaPi2b. Estes termos são sinônimos e podem ser usados de forma intercambiável.

[00230] Como usado aqui, o termo "anticorpo de NaPi2b" ou "anticorpo anti-NaPi2b" é um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno NaPi2b.

[00231] Quando usado aqui no contexto de dois ou mais anticorpos, o termo "compete com" ou "compete de forma cruzada com" indica que os dois ou mais anticorpos competem pela ligação ao NaPi2b, por exemplo, competem pela ligação ao NaPi2b em qualquer ensaio reconhecido na técnica. Um anticorpo "bloqueia" ou "bloqueia de forma cruzada" um ou mais anticorpos da ligação ao NaPi2b se o anticorpo competir com um ou mais outros anticorpos 25% ou mais, com 25% a 74% representando "bloqueio parcial" e 75% -100% representando "bloqueio completo", conforme determinado usando qualquer ensaio reconhecido na técnica. Para alguns pares de anticorpos, a competição ou o bloqueio em qualquer ensaio reconhecido na técnica só é observado quando um anticorpo é revestido na placa e o outro é usado para competir, e não vice-versa. A menos que definido de outra forma ou negado pelo contexto, os termos "compete com", "compete de forma cruzada com", "bloqueia" ou "bloqueia de forma cruzada" quando usados aqui também se destinam a cobrir esses pares de anticorpos.

[00232] Como usado aqui, o termo "anticorpo" refere-se a moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina (Ig), isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a (imunorreage com) um antígeno. Por "ligação específica" ou "imunorreage com" "ou dire-

cionado contra" significa que o anticorpo reage com um ou mais determinantes antigênicos do antígeno desejado e não reage com outros polipeptídeos ou se liga com afinidade muito menor ($K_d > 10^{-6}$). Os anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais e quiméricos.

[00233] Sabe-se que a unidade estrutural básica do anticorpo compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares de idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50 -70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo reconhecimento de antígeno. A porção de carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora. Em geral, as moléculas de anticorpo obtidas em humanos se relacionam com qualquer uma das classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem uma da outra pela natureza da cadeia pesada presente na molécula. Certas classes também têm subclasses, como IgG1, IgG2 e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia kappa ou uma cadeia lambda.

[00234] O termo "anticorpo monoclonal" (mAb) ou "composição de anticorpo monoclonal", como aqui utilizado, refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contêm apenas uma espécie molecular de molécula de anticorpo que consiste em um produto de gene de cadeia leve único e um produto de gene de cadeia pesada único. Em particular, as regiões determinantes da complementariedade (CDRs) do anticorpo monoclonal são idênticas em todas as moléculas da população. Os anticorpos monoclonais (mAbs) contêm um sítio de ligação ao antígeno capaz de imunoreagir com um epítipo particular do antígeno caracterizado por uma afinidade de ligação única para ele.

[00235] Como aqui utilizado, o termo "quimérico" significa que o an-

ticorpo ou a porção de ligação ao antígeno inclui sequências de duas espécies diferentes. Anticorpos quiméricos são moléculas de imunoglobulina compreendendo uma porção humana e não humana. Mais especificamente, a região de combinação de antígeno (região variável) de um anticorpo quimérico é derivada de uma fonte humana e a região constante do anticorpo quimérico que confere função efetora biológica à imunoglobulina é derivada de uma fonte não humana. O anticorpo quimérico deve ter a especificidade de ligação ao antígeno da molécula de anticorpo humano e a função efetora conferida pela molécula de anticorpo não humano. Os métodos de produção de anticorpos quiméricos de acordo com a invenção serão familiares para os especialistas na técnica, ver, por exemplo, Pat. dos EUA N° 4.816.567 Pub. de Ped. de Pat. 5.585.089 e US 20030039649 que são incorporados aqui por referência na sua totalidade. Tais métodos requerem o uso de técnicas recombinantes padrão.

[00236] Em geral, as moléculas de anticorpo obtidas em humanos se relacionam com qualquer uma das classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem uma da outra pela natureza da cadeia pesada presente na molécula. Certas classes também têm subclasses, como IgG1, IgG2 e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia kapa ou uma cadeia lambda.

[00237] O termo "sítio de ligação ao antígeno" ou "porção de ligação" refere-se à parte da molécula de imunoglobulina que participa da ligação ao antígeno. O sítio de ligação ao antígeno é formado por resíduos de aminoácidos das regiões variáveis do terminal N ("V") das cadeias pesada ("H") e leve ("L"). Três trechos altamente divergentes nas regiões V das cadeias pesada e leve, referidos como "regiões hipervariáveis", são interpostos entre trechos de flanqueamento mais conservados, conhecidos como "regiões estruturais" ou "FRs". Assim, o termo "FR" refere-se a sequências de aminoácidos que são naturalmente

encontradas entre e adjacentes a regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Em uma molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada são dispostas uma em relação à outra no espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação ao antígeno. A superfície de ligação ao antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, e as três regiões hipervariáveis de cada uma das cadeias pesada e leve são denominadas "regiões determinantes da complementariedade" ou "CDRs". A designação de aminoácidos para cada domínio é, geralmente, de acordo com as definições de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

[00238] Como usado aqui, o termo "epítipo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou fragmento da mesma, ou um receptor de células T. O termo "epítipo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Os determinantes epitópicos geralmente consistem em grupos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$; por exemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferencialmente $\leq 10 \text{ nM}$ e mais preferencialmente $\leq 1 \text{ nM}$.

[00239] Conforme usado aqui, os termos "ligação imunológica" e "propriedades de ligação imunológica" se referem às interações não covalentes do tipo que ocorrem entre uma molécula de imunoglobulina e um antígeno para o qual a imunoglobulina é específica. A força ou afinidade das interações de ligação imunológica pode ser expressa em

termos da constante de dissociação (K_d) da interação, em que um K_d menor representa uma maior afinidade. As propriedades de ligação imunológica dos polipeptídeos selecionados podem ser quantificadas usando métodos bem conhecidos na técnica. Um desses métodos envolve medir as taxas de formação e dissociação do complexo antígeno/sítio de ligação ao antígeno, em que essas taxas dependem das concentrações dos parceiros complexos, da afinidade da interação e dos parâmetros geométricos que influenciam igualmente a taxa nas duas direções. Assim, tanto a "constante da taxa de associação" (K_{on}) como a "constante da taxa de desassociação" (K_{off}) podem ser determinadas pelo cálculo das concentrações e das taxas reais de associação e dissociação. (Ver Nature 361: 186-87 (1993)). A razão de K_{off}/K_{on} permite o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados à afinidade e é igual à constante de dissociação K_d . (Ver, geralmente, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Um anticorpo da presente descrição se liga especificamente ao NaPi2b, quando a constante de dissociação de equilíbrio (K_d ou K_D) é 1 M, preferencialmente 100 nM, mais preferencialmente 10 nM e mais preferencialmente 100 pM a cerca de 1 pM, conforme medido por ensaios, tais como ensaios de ligação a radioligandos ou ensaios semelhantes, conhecidos dos especialistas na técnica.

[00240] O termo "polinucleotídeo isolado", conforme usado aqui, significará um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA ou sintética ou alguma combinação dos mesmos que, em virtude de sua origem, o "polinucleotídeo isolado" (1) não está associado a todo ou uma porção de um polinucleotídeo no qual o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) está operacionalmente ligado a um polinucleotídeo ao qual não está ligado na natureza ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

[00241] O termo "proteína isolada" aqui referido significa uma prote-

ína de cDNA, RNA recombinante ou origem sintética ou alguma combinação dos mesmos que, em virtude de sua origem ou fonte de derivação, a "proteína isolada" (1) não está associada a proteínas encontradas na natureza, (2) está livre de outras proteínas da mesma fonte, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente ou (4) não ocorre na natureza.

[00242] O termo "polipeptídeo" é usado aqui como um termo genérico para se referir a proteínas, fragmentos ou análogos nativos de uma sequência polipeptídica. Portanto, fragmentos de proteínas nativas e análogos são espécies do gênero polipeptídico.

[00243] O termo "ocorrência natural", conforme usado aqui, aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência polipeptídica ou polinucleotídica presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte natural e que não foi intencionalmente modificado pelo homem no laboratório ou de outra forma ocorre naturalmente.

[00244] O termo "operacionalmente ligado", conforme aqui utilizado, refere-se às posições dos componentes descritos, em uma relação que lhes permite funcionar da maneira pretendida. Uma sequência de controle "operacionalmente ligada" a uma sequência de codificação é ligada de tal maneira que a expressão da sequência de codificação é alcançada em condições compatíveis com as sequências de controle.

[00245] O termo "sequência de controle", conforme aqui utilizado, refere-se a sequências polinucleotídicas necessárias para efetuar a expressão e o processamento de sequências de codificação às quais estão ligadas. A natureza de tais sequências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro nos procariotos, tais sequências de controle geralmente incluem promotor, sítio de ligação ribossômica e sequência de terminação da transcrição nos eucariotos, geralmente, essas sequências de controle incluem promotores e sequência de ter-

minação da transcrição. O termo "sequências de controle" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para expressão e processamento e também pode incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências líder e sequências de parceiros de fusão. O termo "polinucleotídeo", conforme aqui referido, significa um boro polimérico de nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo inclui formas de DNA de fita simples e dupla.

[00246] O termo "oligonucleotídeo" referido aqui inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados ligados entre si por ligações de oligonucleotídeo de ocorrência natural e de ocorrência não natural. Os oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídeos que geralmente compreende um comprimento de 200 bases ou menos. Preferencialmente, os oligonucleotídeos têm 10 a 60 bases de comprimento e mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleotídeos são geralmente de fita simples, por exemplo, para sondas, embora os oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, por exemplo, para uso na construção de um mutante de gene. Os oligonucleotídeos aqui descritos são oligonucleotídeos de sentido ou antissentido.

[00247] Os termos a seguir são usados para descrever as relações de sequência entre duas ou mais sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos: "sequência de referência", "janela de comparação", "identidade de sequência", "porcentagem de identidade de sequência" e "identidade substancial". Uma "sequência de referência" é uma sequência definida usada como base para uma comparação de sequências uma sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, por exemplo, como um segmento de um cDNA de comprimento total ou sequência de genes, fornecida em uma listagem

de sequências ou pode compreender um cDNA completo ou sequência de genes. Geralmente, uma sequência de referência tem pelo menos 18 nucleotídeos ou 6 aminoácidos de comprimento, frequentemente pelo menos 24 nucleotídeos ou 8 aminoácidos de comprimento, e frequentemente pelo menos 48 nucleotídeos ou 16 aminoácidos de comprimento. Uma vez que dois polinucleotídeos ou sequências de aminoácidos podem cada um (1) compreender uma sequência (isto é, uma porção do polinucleotídeo completo ou sequência de aminoácidos) que é semelhante entre as duas moléculas e (2) pode compreender adicionalmente uma sequência que é divergente entre os dois polinucleotídeos ou sequências de aminoácidos, as comparações de sequência entre duas (ou mais) moléculas são tipicamente realizadas comparando sequências das duas moléculas em uma "janela de comparação" para identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. Uma "janela de comparação", como aqui utilizado, refere-se a um segmento conceitual de pelo menos 18 posições nucleotídicas contíguas ou 6 aminoácidos, em que uma sequência polinucleotídica ou sequência de aminoácidos pode ser comparada a uma sequência de referência de sequências de pelo menos 18 nucleotídeos contíguas ou 6 aminoácidos e em que a porção da sequência polinucleotídica na janela de comparação pode compreender adições, deleções, substituições e similares (ou seja, lacunas) de 20% ou menos em comparação com a sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para um alinhamento ideal das duas sequências. O alinhamento ideal de sequências para alinhar uma janela de comparação pode ser realizado pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela busca pelo método de similaridade de Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444 (1988), por implementações computadorizadas des-

ses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks ou pacotes de software MacVector), ou por inspeção, e o melhor alinhamento (ou seja, resultando na maior porcentagem de homologia na janela de comparação) gerada pelos vários métodos é selecionado.

[00248] O termo "identidade de sequência" significa que duas sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos são idênticas (isto é, em uma base nucleotídeo por nucleotídeo ou resíduo por resíduo) na janela de comparação. O termo "porcentagem de identidade de sequência" é calculado comparando duas sequências idealmente alinhadas na janela de comparação, determinando o número de posições nas quais a base de ácido nucleico idêntica (por exemplo, A, T, C, G, U ou I) ou o resíduo ocorre nas duas sequências para gerar o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na janela de comparação (ou seja, o tamanho da janela) e multiplicando o resultado por 100 para gerar a porcentagem de identidade de sequência. Os termos "identidade substancial", conforme aqui utilizados, indicam uma característica de uma sequência de polinucleotídeo ou aminoácido, em que o polinucleotídeo ou aminoácido compreende uma sequência que possui pelo menos 85% de identidade de sequência, preferencialmente pelo menos 90 a 95% de identidade de sequência, mais geralmente pelo menos 99% de identidade de sequência em comparação com uma sequência de referência em uma janela de comparação de pelo menos 18 posições de nucleotídeo (6 aminoácidos), frequentemente em uma janela de pelo menos 24-48 posições de nucleotídeo (8-16 aminoácidos), em que a porcentagem de identidade de sequência é calculada comparando a sequência de referência com a sequência que pode incluir deleções ou adições que totalizam 20% ou menos da sequência de referência na

janela de comparação. A sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior.

[00249] Como aqui utilizado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Ver *Immunology - A Synthesis* (2ª Edição, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Os estereoisômeros (por exemplo, aminoácidos D) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como aminoácidos α -, α -dissubstituídos, aminoácidos N-alquila, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para polipeptídeos da presente descrição. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxi-prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilysina, ϵ -N-acetilysina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxi-lisina, σ -N-metarginina e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (por exemplo, 4-hidroxi-prolina). Na notação polipeptídica usada aqui, a direção à esquerda é a direção do terminal amino e a direção à direita é a direção do terminal carboxi, de acordo com o uso e a convenção padrão.

[00250] Da mesma forma, a menos que especificado de outra forma, a extremidade esquerda das sequências polinucleotídicas de fita simples é a extremidade 5' e a direção esquerda das sequências polinucleotídicas de fita dupla é referida como a direção 5'. A direção da adição 5' a 3' dos transcritos de RNA nascentes é referida como as regiões de sequência de direção de transcrição na fita de DNA que têm a mesma sequência que o RNA e que estão na extremidade 5' a 5' do transcrito de RNA são referidas como "sequências a montante", as regiões de sequência na fita de DNA que possuem a mesma sequência que o RNA e que estão na extremidade 3' a 3' do transcrito do RNA são referidas como "sequências a jusante".

[00251] Conforme aplicado aos polipeptídeos, o termo "identidade

substancial" significa que duas sequências de peptídeos, quando perfeitamente alinhadas, como nos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna ("gap weights") padrão, compartilham pelo menos 80% de identidade de sequência, preferencialmente pelo menos 90% de identidade de sequência, mais preferencialmente pelo menos 95 por cento de identidade de sequência e mais preferencialmente pelo menos 99 por cento de identidade de sequência.

[00252] Preferencialmente, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas.

[00253] As substituições de aminoácidos conservativas referem-se à permutabilidade de resíduos com cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais de hidroxil alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo enxofre é cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservativas preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutâmico-aspartico e asparagina-glutamina.

[00254] Como discutido aqui, pequenas variações nas sequências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina são contempladas como abrangidas pela presente descrição, desde que as variações na sequência de aminoácidos mantenham pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% e mais preferencialmente 99%. Em particular, são contempladas substituições de aminoácidos conservativas. As substituições conservativas são

aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Os aminoácidos geneticamente codificados são geralmente divididos em famílias: (1) aminoácidos ácidos são aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos são lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos não polares são alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano e (4) aminoácidos polares não carregados são glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Os aminoácidos hidrofílicos incluem arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina e treonina. Os aminoácidos hidrofóbicos incluem alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Outras famílias de aminoácidos incluem (i) serina e treonina, que são a família hidroxil alifática; (ii) asparagina e glutamina, que são a família contendo amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que são a família alifática; e (iv) fenilalanina, triptofano e tirosina, que são a família aromática. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado não tenha um efeito importante na ligação ou nas propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido dentro de um sítio da estrutura. Se uma mudança de aminoácido resultar em um peptídeo funcional, ele pode ser prontamente determinado através do teste da atividade específica do derivado polipeptídico. Os ensaios são descritos em detalhes aqui. Análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser prontamente preparados por aqueles versados na técnica. Os terminais amino e carboxi preferidos dos análogos ocorrem perto dos limites dos domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de sequência de

nucleotídeos e/ou aminoácidos com bancos de dados de sequência públicos ou proprietários. Preferencialmente, métodos de comparação computadorizados são usados para identificar motivos de sequência ou domínios de conformação de proteínas previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. São conhecidos métodos para identificar sequências de proteínas que se dobram em uma estrutura tridimensional conhecida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Assim, os exemplos anteriores demonstram que aqueles versados na técnica podem reconhecer motivos de sequência e conformações estruturais que podem ser utilizados para definir domínios estruturais e funcionais de acordo com a descrição.

[00255] As substituições de aminoácidos preferidas são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos proteicos, (4) alteram as afinidades de ligação e (4) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias muteínas de uma sequência diferente da sequência peptídica de ocorrência natural. Por exemplo, substituições únicas ou múltiplas de aminoácidos (preferencialmente substituições de aminoácidos conservativas) podem ser feitas na sequência que ocorre naturalmente (preferencialmente na porção do polipeptídeo fora do(s) domínio(s), formando contatos intermoleculares. Uma substituição de aminoácidos conservativa não deve alterar substancialmente as características estruturais da sequência parental (por exemplo, um aminoácido substituto não deve tender a quebrar uma hélice que ocorre na sequência parental ou interromper outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a sequência parental). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos reconhecidos na técnica são descritos em Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Com-

pany, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

[00256] O termo "agente" é usado aqui para indicar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato feito de materiais biológicos.

[00257] Conforme usado aqui, os termos "etiqueta" ou "etiquetado" se referem à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, pela incorporação de um aminoácido radioetiquetado ou união a um polipeptídeo de porções de biotínil que podem ser detectadas pela avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou calorimétricos). Em certas situações, a etiqueta ou o marcador também pode ser terapêutico. Vários métodos de etiquetar polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser utilizados. Exemplos de etiquetas para polipeptídeos incluem, entre outros, radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeos), etiquetas enzimáticas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, p-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimioluminescentes, grupos biotínil, epítopos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metais, tags de epítipo). Em algumas modalidades, as etiquetas são fixadas por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o possível impedimento estérico. O termo "agente farmacêutico ou fármaco", conforme aqui utilizado, refere-se a um composto ou composição química capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado adequadamente a um paciente.

[00258] Outros termos químicos aqui utilizados são utilizados de acordo com o uso convencional na técnica, como exemplificado pelo The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[00259] Como usado aqui, "substancialmente puro" significa que uma espécie objeto é a espécie predominante presente (ou seja, em uma base molar é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição) e, preferencialmente, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie objeto compreende pelo menos cerca de 50% (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

[00260] Geralmente, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição, mais preferencialmente mais do que cerca de 85%, 90%, 95% e 99%. Mais preferencialmente, a espécie objeto é purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais) em que a composição consiste essencialmente em uma única espécie macromolecular.

[00261] O uso dos artigos "um/uma/uns/umas" e "o/a/os/as" na descrição e nas reivindicações a seguir deve ser interpretado para abranger tanto o singular quanto o plural, a menos que indicado de outra forma aqui ou claramente contradito pelo contexto. Os termos "compreendendo", "tendo", "sendo de" como em "sendo de uma fórmula química", "incluindo" e "contendo" devem ser interpretados como termos abertos (isto é, significa "incluindo mas não limitado a"), salvo indicação em contrário. Por exemplo, uma estrutura polimérica de uma certa fórmula inclui todas as unidades de monômero mostradas na fórmula e também pode incluir unidades de monômero adicionais não mostradas na fórmula. Além disso, sempre que "compreender" ou ou-

tro termo aberto for usado em uma modalidade, deve ser entendido que a mesma modalidade pode ser reivindicada mais estritamente usando o termo intermediário "consistindo essencialmente em" ou o termo fechado "consistindo em".

[00262] O termo "cerca de", "aproximadamente" ou "aproximado", quando usado em conexão com um valor numérico, significa que uma coleção ou faixa de valores está incluída. Por exemplo, "cerca de X" inclui uma faixa de valores que são $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,2\%$ ou $\pm 0,1\%$ de X, em que X é um valor numérico. Em uma modalidade, o termo "cerca de" refere-se a uma faixa de valores que são 5% mais ou menos que o valor especificado. Em outra modalidade, o termo "cerca de" refere-se a uma faixa de valores que são 2% mais ou menos que o valor especificado. Em outra modalidade, o termo "cerca de" refere-se a uma faixa de valores que são 1% mais ou menos que o valor especificado.

[00263] A recitação de intervalos de valores visa meramente servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado dentro do intervalo, a menos que indicado de outra forma aqui, e cada valor separado é incorporado ao relatório descritivo como se fosse aqui recitado individualmente. Uma faixa usada aqui, a menos que especificado de outra forma, inclui os dois limites da faixa. Por exemplo, as expressões "x sendo um número inteiro entre 1 e 6" e "x sendo um número inteiro de 1 a 6" significam "x sendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6", ou seja, os termos "entre X e Y" e "variam de X a Y, incluem X e Y e os números inteiros entre eles.

[00264] "Fármaco": Como usado aqui, o termo "fármaco" refere-se a um composto que é biologicamente ativo e fornece um efeito fisiológico desejado após a administração a um indivíduo em necessidade do mesmo (por exemplo, um ingrediente farmacêutico ativo).

[00265] "Agente antiangiogênese" ou "inibidor da angiogênese" re-

fere-se a uma substância de pequeno peso molecular, um polinucleotídeo, um polipeptídeo, uma proteína isolada, uma proteína recombinante, um anticorpo ou suas proteínas conjugadas ou de fusão que inibe a angiogênese, vasculogênese ou permeabilidade vascular indesejável, direta ou indiretamente. O inibidor da angiogênese inclui os agentes que se ligam e bloqueiam a atividade angiogênica do fator angiogênico ou de seu receptor. Por exemplo, um agente antiangiogênese é um anticorpo ou outro antagonista a um agente angiogênico, incluindo, mas não se limitando a, anticorpos ao VEGF-A ou ao receptor de VEGF-A (por exemplo, receptor KDR ou receptor Flt-1), bloqueador de VEGF, inibidores anti-PDGFR como Gleevec™ (mesilato de imatinibe). Os agentes antiangiogênese também incluem inibidores nativos da angiogênese, por exemplo, angiostatina, endostatina e similares.

[00266] "Citotóxico": Como usado aqui, o termo "citotóxico" significa tóxico para as células ou para uma população celular selecionada (por exemplo, células cancerígenas). O efeito tóxico pode resultar em morte e/ou lise celular. Em certos casos, o efeito tóxico pode ser um efeito destrutivo subletal na célula, por exemplo, retardando ou interrompendo o crescimento celular. Para alcançar um efeito citotóxico, o fármaco ou pró-fármaco pode ser selecionado a partir de um grupo que consiste em um agente prejudicial ao DNA, um agente que perturba o microtúbulo ou uma proteína ou polipeptídeo citotóxico, entre outros.

[00267] "Citostático": Como usado aqui, o termo "citostático" refere-se a um fármaco ou outro composto que inibe ou interrompe o crescimento e/ou multiplicação celular.

[00268] "Molécula pequena": Como usado aqui, o termo "molécula pequena" refere-se a moléculas, de ocorrência natural ou criadas artificialmente (por exemplo, por síntese química) que possuem um peso molecular relativamente baixo. As moléculas pequenas preferidas são

biologicamente ativas na medida em que produzem um efeito local ou sistêmico em animais, preferencialmente mamíferos, mais preferencialmente humanos. Em certas modalidades preferidas, a molécula pequena é um fármaco e a molécula pequena é referida como "molécula de fármaco" ou "fármaco" ou "agente terapêutico". Em certas modalidades, a molécula de fármaco tem PM menor ou igual a cerca de 5 kDa. Em outras modalidades, a molécula de fármaco tem PM menor ou igual a cerca de 1,5 kDa. Em modalidades, a molécula de fármaco é selecionada a partir de alcaloides da vinca, auristatinas, duocarmicinas, tubulisinas, compostos não naturais de camptotecina, inibidores de topoisomerase, fármacos de ligação ao DNA, inibidores de quinase, inibidores de MEK, inibidores de KSP, caliqueamicinas, SN38, pirrol-benzodiazepinas e seus análogos. Preferencialmente, embora não necessariamente, o fármaco já foi considerado seguro e eficaz para uso por uma agência ou órgão governamental apropriado, por exemplo, o FDA. Por exemplo, fármacos para uso humano listados pelo FDA sob 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 a 361 e 440 a 460; fármacos para uso veterinário listados pela FDA sob 21 C.F.R. §§ 500 a 589, aqui incorporados por referência, são todos considerados adequados para uso com os presentes polímeros hidrofílicos.

[00269] "Derivado de fármaco" ou "fármaco modificado" ou semelhante, conforme aqui utilizado, refere-se a um composto que compreende a molécula de fármaco destinada a ser entregue pelo conjugado aqui descrito e um grupo funcional capaz de unir a molécula do fármaco ao veículo polimérico.

[00270] "Forma ativa", como aqui utilizado, refere-se a uma forma de um composto que exibe eficácia farmacêutica pretendida in vivo ou in vitro. Em particular, quando uma molécula de fármaco destinada a ser entregue pelo conjugado aqui descrito é liberada do conjugado, a forma ativa pode ser o próprio fármaco ou seus derivados, que exibem

as propriedades terapêuticas pretendidas. A liberação do fármaco a partir do conjugado pode ser alcançada por clivagem de uma ligação biodegradável do ligante que une o fármaco ao veículo polimérico. Os derivados de fármacos ativos em conformidade podem compreender uma porção do ligante.

[00271] "PHF" refere-se a poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetil-formal).

[00272] Como usado aqui, os termos "unidade polimérica", "unidade monomérica", "monômero", "unidade monômero", "unidade" se referem a uma unidade estrutural repetível em um polímero.

[00273] Como usado aqui, "peso molecular" ou "PM" de um polímero ou veículo/estrutura polimérica ou conjugados de polímero refere-se ao peso molecular ponderal médio do polímero não modificado, a menos que especificado de outra forma.

[00274] Conforme usado neste documento, "tratamento" ou "tratar" descreve o gerenciamento e o cuidado de um paciente com o objetivo de combater uma doença, condição ou distúrbio e inclui a administração de um conjugado da descrição ou uma composição farmacêutica do mesmo para aliviar os sintomas ou complicações de uma doença, condição ou distúrbio, ou para eliminar a doença, condição ou distúrbio.

[00275] Conforme usado aqui, "prevenção" ou "profilaxia" refere-se à redução no risco de desenvolver uma doença ou condição, ou redução ou eliminação do aparecimento dos sintomas ou complicações da doença, condição ou distúrbio.

[00276] O termo "quantidade efetiva" ou "quantidade suficiente", como se refere a um agente ativo, refere-se à quantidade necessária para provocar a resposta biológica desejada. Como aqui utilizado, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "dose terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade ou quantidade de um agente, com-

posto, material ou composição contendo um composto que é pelo menos suficiente para produzir um efeito terapêutico detectável. O efeito pode ser detectado por qualquer método de ensaio conhecido na técnica. A quantidade efetiva precisa para um indivíduo dependerá do peso corporal, tamanho e saúde do indivíduo; a natureza e extensão da condição; e o terapêutico selecionado para administração.

[00277] Um "indivíduo" inclui um animal humano e um não humano, em qualquer estágio do desenvolvimento, incluindo, por exemplo, qualquer mamífero, humano, primata, pássaro, camundongo, rato, galinha, cachorro, gato, vaca, cavalo, cabra, camelo, ovelha ou porco. Preferencialmente, o animal não humano é um mamífero (por exemplo, um roedor, um rato, um camundongo, um coelho, um macaco, um cão, um gato, um primata ou um porco). Um animal pode ser um animal transgênico ou um clone humano. Preferencialmente, o mamífero é um humano. O termo "indivíduo" abrange animais.

[00278] Como usado aqui, um "kit" refere-se a uma combinação de componentes, como uma combinação das composições aqui contidas e outro item para uma finalidade, incluindo, entre outros, reconstituição, ativação e instrumentos/dispositivos para entrega, administração, diagnóstico e avaliação de uma atividade ou propriedade biológica. Os kits incluem opcionalmente instruções de uso.

[00279] Como usado aqui, "entrar em contato" refere-se a reagir, expor, incubar uma amostra ou espécime de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b

[00280] Conforme usado aqui, "resposta da patente" ou "resposta" ou "benefício" do tratamento pode ser avaliada usando qualquer parâmetro que indique um benefício para o paciente, incluindo, sem limitação, (1) inibição, até certo ponto, da progressão da doença incluindo, mas não limitado a, progressão da doença, incluindo desaceleração e parada completa (2) redução no número de episódios e/ou sintomas

da doença (3) redução no tamanho do tumor (4) inibição (ou seja, redução, desaceleração ou parada completa) da disseminação da doença (5) alívio, até certo ponto, de um ou mais sintomas associados à doença (6) mortalidade reduzida em um determinado momento de avaliação após o tratamento.

[00281] Como aqui utilizado, "amostra de tecido" significa uma coleção de células semelhantes obtidas a partir de um tecido de um indivíduo ou um ser. A fonte do tecido pode ser tecido sólido a partir de um órgão, amostra de tecido, biópsia e/ou aspirado fresco, congelado e/ou conservado; sangue ou quaisquer constituintes do sangue, como plasma; fluidos corporais, como fluido espinhal cerebral, líquido amniótico, fluido peritoneal ou fluido intersticial; células de qualquer momento da gestação ou desenvolvimento do indivíduo. A amostra de tecido também pode ser células ou linhas celulares primárias ou cultivadas. Opcionalmente, a amostra de tecido é obtida de um tecido/órgão com a doença. Por exemplo, uma "amostra de tumor" é uma amostra de tecido obtida de um tumor ou outro tecido cancerígeno. A amostra de tecido pode conter uma população mista de tipos de células (por exemplo, células tumorais e não tumorais, células cancerígenas e células não cancerígenas). A amostra de tecido pode conter compostos que não são naturalmente misturados com o tecido na natureza, como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos ou similares.

[00282] O termo "previsão" ou "prever" usado aqui refere-se à probabilidade de um paciente responder favorável ou desfavoravelmente a um fármaco (agente terapêutico) ou conjunto de fármacos ou regime terapêutico. Em uma modalidade, a previsão refere-se à extensão dessas respostas. Em uma modalidade, a previsão refere-se à possibilidade e/ou à probabilidade de um paciente sobreviver ou melhorar após o tratamento, por exemplo, tratamento com um agente terapêuti-

co específico, ou por um certo período de tempo sem recorrência da doença. Os métodos de previsão da invenção podem ser utilizados clinicamente para tomar decisões de tratamento, escolhendo as modalidades de tratamento mais apropriadas para qualquer paciente em particular. Os métodos de previsão da presente invenção são ferramentas valiosas na previsão se é provável que um paciente responda favoravelmente a um regime de tratamento, como um determinado regime terapêutico, incluindo, por exemplo, administração de um determinado agente ou combinação terapêutica, intervenção cirúrgica, tratamento com esteroides etc., ou se é provável a sobrevivência a longo prazo do paciente, após um regime terapêutico.

[00283] "Parâmetros clínicos" abrange todos os status não amostrais ou não NaPi2b do estado patológico do indivíduo ou outras características, como, sem limitação, idade (Age), etnia (RACE), sexo (Sex) ou histórico familiar (FamHX).

[00284] "FN" é falso negativo, o que para um teste de estado patológico significa classificar uma doença objeto incorretamente como não-doença, não-responsiva ao tratamento ou normal.

[00285] "FP" é falso positivo, o que para um teste de estado patológico significa classificar incorretamente um indivíduo normal como tendo uma doença ou respondendo ao tratamento.

[00286] Uma "fórmula", "algoritmo" ou "modelo" é qualquer equação matemática, processo algorítmico, analítico ou programado ou técnica estatística que utiliza uma ou mais entradas contínuas ou categóricas (aqui denominadas "parâmetros") e calcula um valor de saída, às vezes chamado de "índice" ou "valor do índice". Exemplos não limitativos de "fórmulas" incluem somas, razões e operadores de regressão, como coeficientes ou expoentes, transformações e normalizações de valores de biomarcadores (incluindo, sem limitação, os esquemas de normalização baseados em parâmetros clínicos, como sexo, idade ou

etnia). Os modelos preditivos resultantes podem ser validados em outros estudos ou validados cruzadamente no estudo em que foram originalmente treinados, usando técnicas como Bootstrap, Leave-One-Out (LOO) e validação cruzada 10 vezes (10-Fold CV). Em várias etapas, as taxas de descoberta falsa podem ser estimadas por permutação de valor de acordo com técnicas conhecidas na técnica.

[00287] Uma "função de utilidade econômica em saúde" é uma fórmula derivada de uma combinação da probabilidade esperada de uma série de resultados clínicos em uma população de pacientes aplicável idealizada, antes e depois da introdução de uma intervenção diagnóstica ou terapêutica no padrão de tratamento. Ela abrange estimativas das características de precisão, eficácia e desempenho de tal intervenção e uma medição de custo e/ou valor (uma utilidade) associada a cada desfecho, que pode ser derivada dos custos reais de atendimento do sistema de saúde (serviços, suprimentos, dispositivos e medicamentos, etc.) e/ou como um valor aceitável estimado por ano de vida ajustado à qualidade (QALY), resultando em cada desfecho. A soma, em todos os resultados previstos, do produto do tamanho da população previsto para um desfecho multiplicado pela utilidade esperada do respectivo desfecho é a utilidade econômica total da saúde de um determinado padrão de tratamento. A diferença entre (i) a utilidade econômica em saúde total calculada para o padrão de tratamento com a intervenção versus (ii) a utilidade econômica em saúde total para o padrão de tratamento sem a intervenção resulta em uma medição geral do custo ou valor econômico em saúde da intervenção. Isso pode ser dividido entre todo o grupo de pacientes que está sendo analisado (ou apenas entre o grupo de intervenção) para chegar a um custo por unidade de intervenção e orientar decisões como posicionamento no mercado, preços e premissas de aceitação do sistema de saúde. Tais funções de utilidade econômica em saúde são comumente usadas pa-

ra comparar a rentabilidade da intervenção, mas também podem ser transformadas para estimar o valor aceitável por QALY que o sistema de saúde está disposto a pagar ou as características aceitáveis de desempenho clínico rentável necessárias para uma nova intervenção.

[00288] Para intervenções diagnósticas (ou prognósticas) da intervenção, como cada resultado (que em um teste de diagnóstico de classificação de doenças pode ser um TP, FP, TN ou FN) tem um custo diferente, uma função de utilidade econômica em saúde pode preferencialmente favorecer a sensibilidade sobre a especificidade ou PPV sobre NPV com base na situação clínica e nos custos e valor de desfechos individuais e, portanto, fornece outra medição do desempenho e valor econômico em saúde, que pode ser diferente das medições mais diretas de desempenho clínico ou analítico. Essas medições diferentes e compensações relativas geralmente convergirão apenas no caso de um teste perfeito, com taxa de erro zero (ou seja, classificações incorretas de desfecho de indivíduos previsto zero ou FP e FN), que todas as medições de desempenho favorecerão à imperfeição, mas em diferentes graus.

[00289] "Medir "ou" medição" ou, alternativamente, "detectar" ou "detecção" significa avaliar a presença, ausência, volume ou quantidade (que pode ser uma quantidade efetiva) de uma determinada substância em uma amostra clínica ou derivada de um indivíduo, incluindo a derivação de níveis qualitativos ou quantitativos de concentração de tais substâncias ou avaliar os valores ou categorização dos parâmetros clínicos não analíticos de um indivíduo.

[00290] O "valor preditivo negativo" ou "NPV" é calculado por $TN/(TN+FN)$ ou pela fração negativa verdadeira de todos os resultados negativos do teste. Também é inerentemente impactado pela prevalência da doença e pela probabilidade pré-teste da população que deve ser testada. Ver, por exemplo, O'Marcaigh A S, Jacobson R M, "Es-

estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results," Clin. Ped. 1993, 32(8): 485-491, que discute especificidade, sensibilidade e valores preditivos positivos e negativos de um teste, por exemplo, um teste de diagnóstico clínico. Frequentemente, para abordagens de classificação de estado patológico binária usando uma medição de teste diagnóstico contínuo, a sensibilidade e a especificidade são resumidas pelas curvas de Características Operacionais do Receptor (ROC) de acordo com Pepe et al, "Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker," Am. J. Epidemiol 2004, 159 (9): 882-890 e resumido pela área sob a curva (AUC) ou estatística-c, um indicador que permite a representação da sensibilidade e especificidade de um teste, ensaio ou método em toda a faixa de pontos de corte do teste (ou ensaio) com apenas um único valor. Ver também, por exemplo, Shultz, "Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures," chapter 14 in Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4.sup.th edition 1996, W.B. Saunders Company, páginas 192-199; e Zweig et al., "ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease," Clin. Chem., 1992, 38(8): 1425-1428. Uma abordagem alternativa usando funções de verossimilhança, razão de chances, teoria da informação, valores preditivos, calibração (incluindo qualidade do ajuste) e medições de reclassificação é resumida de acordo com Cook, "Use and Misuse of the Receiver Operating Characteristic Curve in Risk Prediction," Circulation 2007, 115: 928-935. Finalmente, as razões de probabilidade e as razões de risco absoluto e relativo nas coortes dos indivíduos definidas por um teste são uma medição adicional da precisão e utilidade clínicas. Vários métodos são frequentemente usados para definir valores anormais ou de doenças, incluindo limites de refe-

rência, limites de discriminação e limites dos riscos.

[00291] "Precisão analítica" refere-se à reprodutibilidade e previsibilidade do próprio processo de medição e pode ser resumido em tais medições como coeficientes de variação e testes de concordância e calibração das mesmas amostras ou controles com diferentes tempos, usuários, equipamentos e/ou reagentes. Essas e outras considerações na avaliação de novos biomarcadores também estão resumidas em Vasan, 2006.

[00292] "Desempenho" é um termo que se refere à utilidade e qualidade gerais de um teste de diagnóstico ou prognóstico, incluindo, entre outros, precisão clínica e analítica, outras características analíticas e de processo, como características de uso (por exemplo, estabilidade, facilidade de uso), valor econômico em saúde e custos relativos dos componentes do teste. Qualquer um desses fatores pode ser a fonte de desempenho superior e, portanto, a utilidade do teste, e pode ser medido por "métricas de desempenho" apropriadas, como AUC, tempo de resultado, prazo de validade, etc., conforme relevante.

[00293] O "valor preditivo positivo" ou "PPV" é calculado por $TP/(TP+FP)$ ou pela fração positiva verdadeira de todos os resultados de testes positivos. É inerentemente impactado pela prevalência da doença e pela probabilidade pré-teste da população que deve ser testada.

[00294] A "sensibilidade" é calculada por $TP/(TP+FN)$ ou pela fração positiva verdadeira dos indivíduos.

[00295] A "especificidade" é calculada por $TN/(TN+FP)$ ou pela fração negativa verdadeira de indivíduos normais.

[00296] Por "estatisticamente significativo", entende-se que a alteração é maior do que se espera que aconteça apenas por acaso (o que poderia ser um "falso positivo"). A significância estatística pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica. As medições de

significância comumente usadas incluem o valor p , que apresenta a probabilidade de obter um resultado pelo menos tão extremo quanto um dado ponto de dados, assumindo que o ponto de dados foi resultado por acaso apenas. Um resultado é considerado altamente significativo com um valor p de 0,05 ou menos. Preferencialmente, o valor p é 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 ou menos.

[00297] "Fatores de risco laboratoriais tradicionais" correspondem a biomarcadores isolados ou derivados de amostras de indivíduos e atualmente são avaliados no laboratório clínico e usados em algoritmos tradicionais de avaliação de risco global. Os fatores de risco laboratoriais tradicionais para recorrência de tumores incluem, por exemplo, índice proliferativo, linfócitos infiltrantes de tumor. Outros fatores de risco laboratoriais tradicionais para recorrência de tumores conhecidos pelos especialistas na técnica.

[00298] Todos os métodos aqui descritos podem ser realizados em qualquer ordem adequada, a menos que indicado de outra forma aqui ou de outra forma claramente contestado pelo contexto. O uso de todo e qualquer exemplo ou linguagem exemplificativa (por exemplo, "tal como") aqui provido visa meramente ilustrar melhor a divulgação e não deve ser interpretado como uma limitação no escopo das reivindicações, a menos que explicitamente reivindicado de outra forma. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando que qualquer elemento não reivindicado é essencial para o que é reivindicado.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Clonagem, produção e purificação de MERS67

[00299] MERS67 é um anticorpo quimérico de coelho-humano que foi projetado com base no anticorpo anti-NaPi2b humanizado, XMT-1535 (isto é, RebMab200 (Lopes dos Santos, 2013)). Consiste nas sequências variáveis das cadeias pesada e leve humanas anexadas à

região constante de IgG1 de coelho ou à região C da cadeia kappa-b4 de Ig de coelho, respectivamente. As sequências de DNA alvo foram projetadas com otimização de códon a partir das sequências de aminoácidos das regiões variáveis humanizadas das cadeias pesada e leve e das regiões constantes do coelho. A síntese gênica, construção do vetor de expressão, preparação do plasmídeo e expressão transitória foi realizada no GenScript®. Sequências de DNA para a cadeia pesada e leve quimérica são fornecidas na Figura 1. Para produção, as células ExpiCHO-S foram cultivadas em meio de expressão ExpiCHO™ isento de soro (Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas em frascos Erlenmeyer (Corning Inc., Acton, MA) a 37°C com 8% de CO₂ em um agitador orbital. (VWR Scientific). Um dia antes da transfecção, as células foram semeadas a uma densidade apropriada nos frascos Erlenmeyer Corning. No dia da transfecção, o DNA e o reagente de transfecção foram misturados em uma razão ideal e depois adicionados ao frasco com células prontas para a transfecção. Os plasmídeos recombinantes que codificam cadeias pesadas e leves de Mers67 foram cotransfectados transitoriamente em culturas de células ExpiCHO-S em suspensão. As células foram transferidas para a incubadora a 32°C com 5% de CO₂ no dia 1 após a transfecção para a cultura restante. O intensificador e a alimentação (Thermo Fisher Scientific) foram adicionados no dia 1 e a alimentação foi adicionada no dia 5 após a transfecção. O sobrenadante da cultura de células coletado no dia 14 foi usado para purificação.

[00300] O caldo de cultura celular foi centrifugado e seguido por filtração. O sobrenadante filtrado foi carregado na coluna de proteína A (GenScript, N° Cat. L00433) a 3 mL/min. Após lavagem e eluição com tampão apropriado, as frações eluídas foram trocadas por tampão para PBS. A proteína alvo foi adicionalmente purificada através da coluna HiLoad Superdex 200 16/600 pg (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)

para remover agregados de alto peso molecular. A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE, Western blot e SEC-HPLC usando protocolos padrão para medições de peso molecular, rendimento e pureza, como mostrado na Figura 2 e Figura 3A (após uma etapa de purificação, lote U0859BH) e Figura 3B (após purificação em duas etapas, LotU5696BL). 5 µg de amostra foram carregados em SDS-PAGE e 0,3 µg de proteína total foram carregados em Western blot. O anticorpo primário para Western blot foi o IgG-HRP anti-coelho de cabra (GenScript, N° Cat. A00131).

Exemplo 2: Ligação de MERS67 ao peptídeo de NaPi2b humano.

[00301] A ligação de MERS67 foi avaliada em comparação com a ligação do anticorpo parental, XMT-1535.

[00302] O peptídeo de NaPi2b ciclizado humano foi gerado e liofilizado cobrindo os aminoácidos identificados no epítopo XMT-1535 (New England Peptide, Gardner, MA). Para o ELISA, o peptídeo de NaPi2b liofilizado foi reconstituído em DMSO. Utilizou-se o peptídeo de NaPi2b humano para revestir placas ELISA límpidas de alta ligação de 96 poços (Corning, 3369) a 1 µg/mL em tampão de carbonato de sódio, pH 9 a um volume total de 100 µl por poço. Após uma incubação de 2 horas, as placas foram lavadas 4 vezes com 100 µl por poço TBS-Tween 20, bloqueadas com BSA a 3% em TBS-Tween 20 (100 µl por poço) por 1 hora e lavadas novamente. Os artigos de teste, MERS67 (Lote U0859BH e Lote U5569BL), XMT-1535 e o controle sem ligação (trastuzumabe) foram adicionados aos poços em uma faixa de concentração de dose de 100 nM a 0,002 nM usando uma diluição em série 3 vezes de 8 pontos em tampão TBS-Tween 20 a 100 µl por poço. As placas foram incubadas durante 1 hora com agitação e lavadas como acima. O anticorpo secundário específico para o fragmento F(ab')₂ de IgG anti-humana de cabra AffiniPure conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch, 109-035-097) foi usado a

5000x em tampão TBS-Tween 20 a 100 µl por poço para XMT-1535 e Trastuzumabe e anticorpo secundário de HRP anti-coelho de cabra (Abcam, ab6721) foi usado para MERS67. As placas foram novamente incubadas durante 1 hora com agitação seguida de lavagem como acima. O substrato TMB (Bethyl Lab, E102) foi adicionado a 50 µl por poço e incubado até a cor aparecer e a reação foi resfriada brusca-mente com uma quantidade igual de H₂SO₄ 0,2N. A densidade ótica (O.D.) foi medida a 450 nm com um leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A O.D. para cada tratamento foi representada graficamente e o K_d calculado para cada anticorpo com o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) por regressão não linear usando o modelo de ligação sítio-específica.

[00303] Nos dois lotes examinados (lote U0859BH e lote U5696BL), o MERS67 ligou-se ao NaPi2b humano com K_d de 0,25561 nM e 0,1045 nM, respectivamente; XMT-1535 ligou-se ao NaPi2b humano com um K_d de 0,536 nM. Um anticorpo de controle negativo não mostrou ligação.

Exemplo 3 MERS67 Pode detectar NaPi2b em um formato imuno-histoquímico de FFPE

[00304] Os níveis de expressão de NaPi2b na superfície celular foram confirmados por citometria de fluxo. 100 µl de 1x10⁶ de células OVCAR3 ou JIMT-1 foram incubados por uma hora em gelo com RebMAB200 conjugado com ficoeritrina a 5 µg/ml. Utilizando um kit de calibração de fluorescência PE Quantibrite PE (BD BioSciences) e um instrumento MACS Quant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), o número de receptores de superfície celular foi calculado em relação à curva padrão em 1,95 x10⁵ e 120 para OVCAR3 e JIMT-1, respectivamente.

[00305] Os blocos embebidos em parafina fixados com formalina de

xenoinxerto e péletes de células foram preparados a partir de linhas celulares de OVCAR3 e JIMT-1 utilizando métodos padrão.

[00306] Para análise imuno-histoquímica manual, o kit DAKO Envision+System-HRP (DAB) (K4010, Agilent, Santa Clara, CA) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as lâminas foram seccionadas a 5 μ , cozidas a 56°C por 15 minutos e reidratadas através de xileno e álcoois graduados. Antes do bloqueio da peroxidase, as lâminas foram recuperadas em uma solução de pH 6,0 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a 99°C. Para a etapa de incubação do anticorpo primário, o MERS67 foi titulado inicialmente em uma faixa de diluições no diluente DAKO com componentes redutores de fundo (S3022, Agilent, Santa Clara, CA). Um controle de anticorpo "não primário" foi incluído em algumas execuções experimentais para avaliar o método para fundos não específicos. As lâminas foram contrastadas com Hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas para exame por microscopia de luz. Várias titulações foram comparadas em uma série de xenoinxertos com resposta conhecida ao conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, conforme descrito WO 2017/160754 in vivo, e uma titulação foi escolhida que produziu coloração IHC que, por meio da leitura microscópica de luz visual, melhor distinguiu os respondedores e não respondedores em uma série de modelos pré-clínicos de xenoinxerto. Os resultados para a coloração de xenoinxerto de OVCAR3 e JIMT1 são mostrados na Figura 4. A imuno-histoquímica também foi estabelecida usando uma plataforma automatizada TechMate 500 ou TechMate 1000 (BioTek Solutions/Ventana medical Systems), onde várias condições de recuperação de antígenos e titulações de anticorpos primários foram testadas para desenvolver um protocolo de produção mais elevada. Um protocolo foi selecionado com base na coloração do material de controle e na coloração do material pré-clínico com resposta conhecida ao tratamento

com ADC. Resumidamente, para o protocolo estabelecido, seções de 4 µ foram cortadas, desparafinadas e reidratadas através de xileno e uma série de álcoois. As lâminas tiveram os antígenos recuperados em um vaporizador padrão usando a solução de recuperação BioGenex AR-10. Na plataforma TechMate, uma recuperação adicional foi realizada com Proteinase K (DAKO). Após o bloqueio sérico: o anticorpo primário foi aplicado por 30 minutos à temperatura ambiente, depois a detecção baseada em polímero não biotina e bloqueio de peroxidase endógena (sistema de detecção Polink-2 Plus de coelho, GBI) foi usada e, finalmente, uma breve contracoloração com hematoxilina.

Exemplo 4: MERS67 foi usado para detectar a imunorreatividade em tumores humanos e em modelos de xenoenxerto primário humano.

[00307] Utilizando o método manual desenvolvido para IHC, um microarranjo de tecido de tumor de pulmão humano consistindo em 37 tumores foi corado com MERS67. 21/37 (57%) dos núcleos de tecido apresentaram imunorreatividade à membrana detectável. A coloração imuno-histoquímica de dois adenocarcinomas pulmonares humanos é mostrada na Figura 5.

[00308] Um microarranjo de tecido adicional com uma variedade de tipos de tumor também foi avaliado, e a imunorreatividade foi observada no carcinoma ovariano e muito focalmente em um colangiocarcinoma. A imunorreatividade também poderia ser detectada em um modelo de xenoenxerto primário humano de carcinoma do ducto salivar.

Exemplo 5: Resposta do crescimento tumoral à administração de conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b

[00309] Os modelos de xenoenxerto de carcinoma primário de ovário foram de um conjunto de modelos de tumor derivados de câncer de ovário seroso ou trompa de Falópio e implantados em camundongos

imunocomprometidos que foram tratados com 3 mg/kg de conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, descrito em WO 2017/160754, semanalmente por três semanas em grupos de $n = 3$, uma vez que os tumores atingiram um volume médio estratificado de 125-250 mm³. Os animais não tratados nos grupos de $n = 2-4$ foram incluídos como controle. O objetivo final do estudo foi um volume tumoral de 1 cm³ ou 45 dias. Em um caso de resposta completa, os camundongos foram acompanhados por um longo período de tempo para avaliar o crescimento do tumor. A Figura 6 é um gráfico de barras que mostra a melhor resposta mediana calculada em relação ao dia 0 em cada momento de avaliação para cada animal e depois expressa como o valor mediano da melhor resposta para cada modelo. O eixo y mostra a melhor resposta mediana; o eixo x mostra o número do modelo. Os modelos foram derivados de pacientes que haviam recebido tratamento prévio e pacientes que não receberam tratamento. O efeito antitumoral do conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b foi observado em ambas as classes de tumor. As barras são coloridas como derivadas de tumores sem tratamento (barra escura) ou pós-tratamento (barra clara). Dos 10 modelos que apresentaram uma melhor resposta mediana entre -50 e -100, 5 foram derivados de tumores sem tratamento e 5 de tumores previamente tratados.

[00310] O modelo ST206, onde foi observado um efeito de crescimento antitumoral sustentado, foi continuado por um longo período de tempo. Os tecidos obtidos no final do estudo (dia 73) em um tumor com resposta incompleta foram avaliados quanto à expressão de NaPi2b por IHC e mostraram expressão de NaPi2b.

[00311] Os bloqueios tumorais de animais do estudo não tratados foram avaliados para determinar uma relação padrão de eficácia/coloração. O padrão de coloração observado nos modelos de câncer de ovário foi comparado com a coloração observada nos tumores

primários humanos. A Figura 7 é um gráfico de barras mostrando os modelos START Ovarian, ordenados pela melhor resposta mediana; colorido pelo escore H (todos os modelos). Quanto mais escura a cor, maior o escore H. O conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b induziu pelo menos 50% de redução no volume do tumor em relação ao valor basal em modelos 10/20 (50%) quando administrado na dose de 3 mg/kg uma vez por semana, durante 3 semanas. Não houve diferença significativa na taxa de regressão entre os modelos de tumor sem tratamento e expostos ao tratamento (5/8, 5/12, respectivamente). Entre os tumores de xenoenxertos com escore H ≥ 70 , 10/13 (76%) dos modelos alcançaram redução de 50% ou mais no volume do tumor após o tratamento com um conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b, vs 0/7 (0%) de modelos com escore H < 70 . Aplicando o mesmo ensaio de IHC em tumores primários de ovário humano, 12/20 (60%) dos tumores testados apresentaram escore H ≥ 70 . Houve uma associação entre o escore H de NaPi2b em IHC e a alteração do volume do tumor após o tratamento com conjugado fármaco-anticorpo polimérico direcionado ao NaPi2b (coeficiente de correlação de postos de Spearman 0,76).

[00312] Usando o método IHC automatizado, uma série 20 adenocarcinomas de pulmão humano, 20 carcinomas de ovário e 20 modelos de xenoenxerto de carcinoma de ovário primário humano foi examinada e interpretada usando o método "escore H". O escore H incorpora a intensidade da coloração (determinada pelo aumento da intensidade de 0 a 3+), bem como a porcentagem de células positivas detectadas na membrana celular do tumor. $\text{Escore H} = (\% \text{ a } <1+ \times 0) + ((\% \text{ a } 1+) \times 1) + ((\% \text{ a } 2+) \times 2) + ((\% 3+) \times 3)$. Os escores H variaram de 1-220, 1-250 e 0-290 para os tecidos pulmonar, ovariano e de xenoenxerto, respectivamente, como mostrado em um gráfico de dispersão na Figura 8, onde os escores H representados graficamente (eixo y) e o

tipo de tecido (x eixo), são coloridos pela melhor resposta mediana para os xenoenxertos.

Exemplo 6: Classificação do câncer de pulmão

[00313] A classificação histopatológica do câncer de pulmão é baseada em características morfológicas, mas pode exigir colorações imuno-histoquímicas auxiliares para um diagnóstico preciso. O carcinoma de células não pequenas pode ser dividido em vários subtipos, incluindo o Carcinoma de Células Escamosas (CEC) e Adenocarcinoma (ACA). O uso de agentes terapêuticos específicos pode ser indicado ou contraindicado em diferentes subtipos de câncer de pulmão (ver, por exemplo, Am J Surg Pathol., Volume 35, Número 35, Número 1, janeiro de 2011. Atualmente, painéis de colorações imuno-histoquímicas são empregados para categorizar tumores, por exemplo, Citoqueratina 5/6, TTF-1, Napsina A, p40 e p63. A proteína de NaPi2b, detectada por MERS67, tem expressão no tecido pulmonar normal incluindo em tipos de células que podem ser precursores do ACA pulmonar (isto é, células alveolares do Tipo II) e pode ser um marcador para adenocarcinoma. Pode ser empregado como um marcador de coloração único ou usado para melhorar os atuais painéis imunoistoquímicos.

[00314] Além disso, dados de fontes de dados publicamente disponíveis, valores de expressão de RNA de genes comumente testados no nível de proteína em um formato IHC, imitam os perfis de IHC característicos de adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, em uma base populacional. Visualizar os dados de expressão em larga escala com base em um tumor individual também sugere que a compreensão do nível de expressão de NaPi2b poderia ajudar a refinar a classificação de adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas.

[00315] A Figura 9 é um gráfico de curva de distribuição e variância

(Box Plot) que mostra os dados de RNAseq extraídos de The Cancer Genome Atlas (TCGA) mostrando a expressão diferencial de NaPi2b, Napsina A, CK5 e TTF1 no SCC e ACC de pulmão. Painéis imunohistoquímicos que detectam a expressão de proteínas de painéis como Napsina A, CK5 e TTF1 podem ser usados na classificação de carcinoma de pulmão de células escamosas e adenocarcinoma de pulmão. A detecção da expressão de NaPi2b pode ser usada para complementar o painel atualmente usado.

[00316] A Figura 10 é um gráfico de dispersão mostrando os dados de RNAseq extraídos do TCGA. NaPi2b é mostrado no eixo x e Napsina A é mostrada no eixo y. A expressão da citoqueratina 5 é indicada pela cor, sendo o mais escuro o nível de expressão mais alto. A maioria dos tecidos anotados como carcinoma de células escamosas (forma de círculo) está contida na forma oval de linha cheia. A maioria dos tecidos anotados como adenocarcinoma (forma quadrada) está no quadrante superior direito do gráfico. Alguns tumores classificados como área de carcinoma de células escamosas também localizados no quadrante superior direito, marcados com o círculo tracejado e são baixos expressores de citoqueratina. O uso de um marcador de proteína, como NaPi2b, pode refinar a classificação de tumores como os do círculo tracejado.

[00317] A Figura 11 mostra os dados provisórios do TCGA de 21 de maio de 2018 para o SCC e o ACA do pulmão extraídos do cBioPortal (Cerami et al Cancer Discov May 1 2012 (2) (5) 401-404; Gao et al, Sci Signal. 2013 Apr 2;6(269):pl) e representados graficamente para mostrar a relação da expressão de RNA de NaPi2b em comparação com os valores de expressão de RNA dos genes TTF-1, Napsina A, CK5, p63 que são mais convencionalmente avaliados por IHC para diferenciar SCC e ACA no contexto clínico. A linha superior mostra os resultados de RNA do ACA e, na linha inferior, os resultados de RNA do

SCC. NaPi2b é mostrado no eixo x e o gene de interesse é mostrado no eixo y. Parece haver uma correlação entre a expressão de RNA de NaPi2b com os genes Napsina A para ACA, enquanto outros genes parecem ter uma correção menor ou não correlacionados.

[00318] A Figura 12 mostra os dados provisórios do TCGA de 21 de maio de 2018 para o SCC e o ACA do pulmão extraídos do cBioPortal (Cerami et al. *Cancer Discov* May 1 2012 (2) (5) 401-404; Gao et al, *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl) e representados graficamente para mostrar a expressão dos genes SCL34A2, TTF-1, Napsina-A, CK5 e p63 em ACA e SCC. Em cada gráfico, os resultados de ACA estão à esquerda. O eixo y é uma medida da expressão do RNA, conforme determinado pelo RNAseq. Os resultados mostram que, no geral, a expressão de SLC34A2 parece mais alta no adenocarcinoma em relação ao carcinoma de células escamosas.

[00319] Embora as distinções feitas com base na expressão de RNA se sobreponham um pouco às proteínas avaliadas na clínica pelo IHC, a classificação baseada no RNA baseada nos genes comumente usados não foi validada. Uma tentativa imparcial publicada de encontrar genes mais diferencialmente expressos no câncer de pulmão só retornou TTF1/TITF1 na lista de genes de SCC vs ACA (Wilkerson et al, *Journal of Molecular Diagnostics*, 2013 15: 4, 485-497), sugerindo que o perfila de RNA baseado nos genes usados para diferenciação pelo IHC não é a melhor maneira de fazer a distinção entre ACA e SCC.

Exemplo 7: Diferenciando ACA de SCC usando a expressão de proteína de NaPi2b

[00320] Um ensaio imuno-histoquímico para MERS67 foi estabelecido em um instrumento Leica BondRx. O ensaio foi realizado em microarranjos de tecido (TMA), incluindo linhagens celulares de NSCLC e de câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), e um arranjo tu-

moral humano de NSCLC. Os tumores no arranjo de NSCLC foram previamente classificados com base apenas em características morfológicas. Todos os arranjos foram pontuados com base no método de escore H.

[00321] Para caracterizar adicionalmente os tumores primários, o TMA de tumor foi corado com TTF-1 e p40, marcadores de ACA e carcinoma de células escamosas (SCC), respectivamente. Os resultados desta coloração foram comparados com os padrões de coloração de MERS67. Os escores H no TMA da linha celular de NSCLC variaram de 0-260 e de 0 a 100 no TMA de carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC). Dentro do microarranjo de tecidos, 99 casos individuais foram avaliados. Pela classificação morfológica, 63 casos eram SCC e 23 casos eram ACA. Usando um ponto de corte arbitrário de H = 50, houve uma diferença estatisticamente significativa no número de casos de ACA positivos para NaPi2b (19/23) vs SCC (3/63). A Figura 13 é um gráfico de curva de distribuição e variância dos escores H derivados do IHC de MERS67 comparando SCC vs ACA, quando esses tumores foram classificados apenas por morfologia.

[00322] A Figura 14 mostra os resultados da coloração de NaPi2b com base na histologia para a coorte de NSCLC apenas naquelas amostras em que a classificação de ACA vs SCC por histologia e resultados de TTF-1/p40 IHC estavam de acordo. O escore H de NaPi2b, conforme determinado por IHC, é plotado no eixo Y e o subtipo histológico é caracterizado no eixo X. Entre os 43 casos em que o p40 e o TTF-1 foram avaliados e estavam de acordo com o diagnóstico morfológico, 7/7 casos de ACA foram positivos para NaPi2b, enquanto 0/36 de SCC foram positivos

OUTRAS MODALIDADES

[00323] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com a sua descrição detalhada, a descrição anterior pretende ilustrar e não

limitar o escopo da invenção, que é definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. detectar se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b;

b. detectar a ligação entre NaPi2b e o anticorpo; e

c. prever que o paciente será responsivo ao tratamento quando for detectada a presença de NaPi2b na amostra de tumor.

2. Método de prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. detectar se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b;

b. detectar ligação entre NaPi2b e o anticorpo anti-NaPi2b;
e

c. pontuar patologicamente a detecção, em que um escore patológico se correlaciona com a capacidade de resposta ao tratamento.

3. Método de prever a capacidade de resposta de um paciente com câncer ao tratamento com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, caracterizado pelo fato de que compreende

a. medir o nível de expressão de NaPi2b em uma amostra de tumor obtida do paciente colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b; e

b. prever que o paciente será responsivo ao tratamento quando o nível de expressão de NaPi2b na amostra de tumor for maior que um ponto de corte predeterminado.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente a administração de um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b a um indivíduo previsto como responsivo.

5. Método para tratar um câncer em um indivíduo com um conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. detectar se NaPi2b está presente em uma amostra de tumor obtida do paciente colocando em contato a amostra de tumor com um anticorpo anti-NaPi2b;

b. detectar ligação entre NaPi2b e o anticorpo anti-NaPi2b;

c. prever que o paciente será responsivo ao tratamento com o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b quando for detectada a presença de NaPi2b na amostra de tumor;

d. administrar o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b a um indivíduo previsto como responsivo.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a previsão é realizada pontuando a detecção da etapa (b) patologicamente, em que um escore patológico se correlaciona com a capacidade de resposta ao tratamento.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a previsão é realizada determinando que o nível de expressão de NaPi2b na amostra de tumor é superior a um ponto de corte predeterminado.

8. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 7, caracterizado pelo fato de que o ponto de corte predeterminado é calculado pelo método escore H.

9. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 6, caracterizado pelo fato de que o escore patológico é um escore quantitativo ou semiquantitativo.

10. Método de acordo com a reivindicação 2, 6 ou 9, caracterizado pelo fato de que o escore patológico é determinado por microscopia de luz ou análise de imagem.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer que expressa NaPi2b.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o câncer que expressa NaPi2b é câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de rim, câncer de tireoide, câncer renal, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial, colangiocarcinoma, câncer de tireoide papilar ou câncer renal papilar.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o câncer de pulmão é carcinoma pulmonar não pequeno (NSCLC).

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o NSCLC é um NSCLC não escamoso.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o NSCLC é adenocarcinoma.

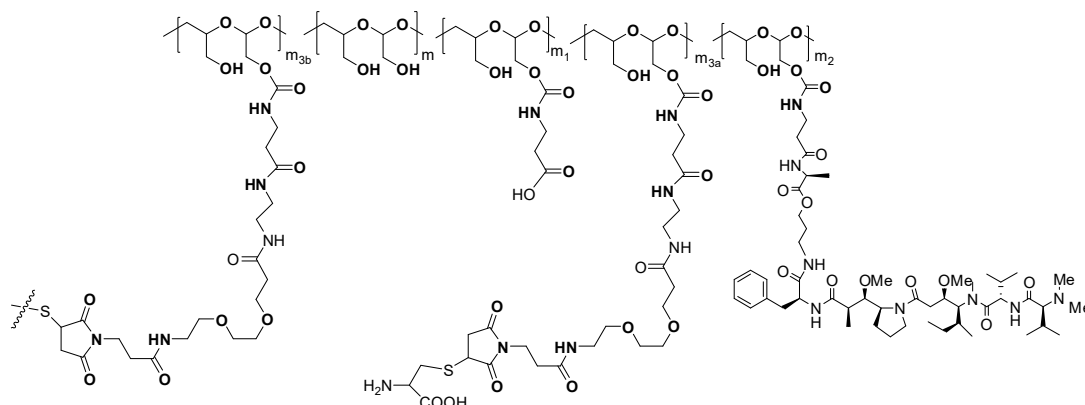
16. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o câncer de ovário é um câncer de ovário epitelial.

17. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o câncer de ovário é um câncer de ovário refratário à platina.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é XMT-1535.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b compreende: uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo a sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo a sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo a sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é:



em que:

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,

m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,
 m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,
 m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,
 m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8;
 a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 18; e
 a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , e m_{3b} varia de 15 a cerca de 300;

o terminal $\text{-}\xi\text{-}$ denota a união de uma ou mais estruturas poliméricas ao anticorpo XMT-1535 direcionado ao NaPi2b

21. Método para subtipar um carcinoma de pulmão de células não pequenas como adenocarcinoma caracterizado pelo fato de que compreende detectar se NaPi2b está presente em uma amostra de carcinoma de células não pequenas colocando em contato a amostra com um anticorpo anti-NaPi2b e detectando a ligação entre NaPi2b e o anticorpo; e subtipar um carcinoma de pulmão de células não pequenas como adenocarcinoma quando a presença de NaPi2b na amostra for detectada.

22. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a detecção de um ou mais TTF-1, Napsina A, p63, p40 ou CK5/6 em uma amostra de carcinoma de pulmão de células não pequenas.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a dita detecção é realizada imuno-histoquimicamente.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-NaPi2b é um anticorpo quimérico.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo quimérico compreendendo uma região variável humana e uma região constante não humana.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo quimérico compreende a região variável do anticorpo XMT-1535.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a região constante não humana é coelho.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a amostra de tecido é uma amostra embebida em parafina e fixada em formalina.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é detectado com um anticorpo secundário etiquetado.

30. Anticorpo quimérico caracterizado pelo fato de que compreende: uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 1 (CDRH1) compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 2 (CDRH2) compreendendo a sequência de aminoácidos AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), uma região determinante de complementariedade da cadeia pesada variável 3 (CDRH3) compreendendo a sequência de aminoácidos GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 1 (CDRL1) compreendendo a sequência de aminoácidos SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos YTSSLYS (SEQ ID NO: 6), uma região determinante de complementariedade da cadeia leve variável 2 (CDRL2) compreendendo a sequência de aminoácidos QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

31. Anticorpo quimérico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende a cadeia pesada variável da SEQ ID No: 1 e a cadeia leve variável da SEQ ID No: 2.

32. Anticorpo quimérico de acordo com a reivindicação 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que a região constante é uma região constante de coelho.

33. Anticorpo quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG1 de coelho e uma cadeia leve da região constante kappa de coelho.

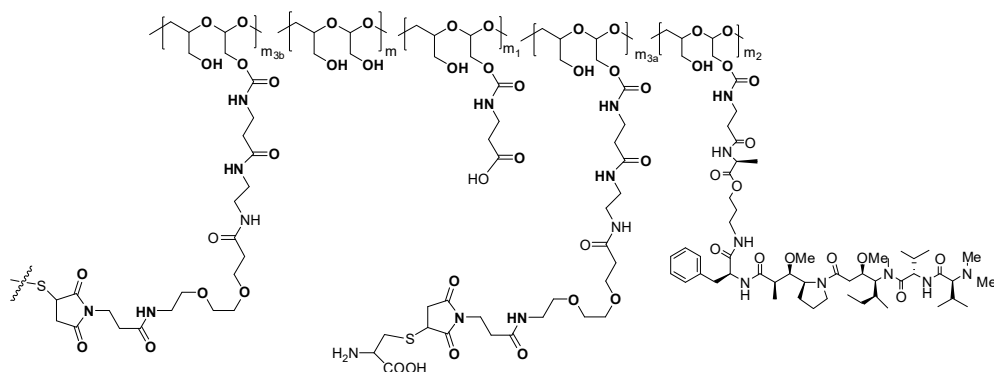
34. Anticorpo quimérico de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende a região constante de cadeia pesada de SEQ ID No: 11 e a região constante de cadeia leve da SEQ ID NO: 12

35. Plasmídeo caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 e/ou SEQ ID NO: 18

36. Célula caracterizado pelo fato de que compreende o plasmídeo como definido na reivindicação 35.

37. Método de tratamento de câncer de tireoide papilar, câncer renal papilar, adenocarcinoma do ducto salivar, câncer endometrial ou colangiocarcinoma caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo do conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b em uma quantidade suficiente para aliviar o sintoma do câncer.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o conjugado de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b é:



em que:

m é um número inteiro de 1 a cerca de 300,

m_1 é um número inteiro de 1 a cerca de 140,

m_2 é um número inteiro de 1 a cerca de 40,

m_{3a} é um número inteiro de 1 a cerca de 17,

m_{3b} é um número inteiro de 1 a cerca de 8;

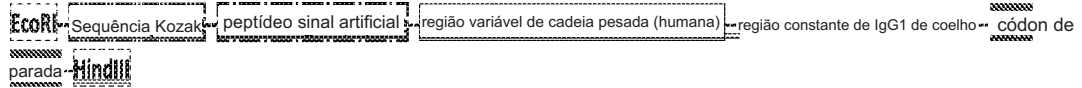
a soma de m_{3a} e m_{3b} varia de 1 e cerca de 18; e

a soma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , e m_{3b} varia de 15 a cerca de 300;

o terminal $\begin{array}{c} -\xi- \\ \sim \end{array}$ denota a união de uma ou mais estruturas poliméricas ao anticorpo XMT-1535 direcionado ao NaPi2b.

FIG. 1

Cadeia pesada de comprimento total de Mers67:



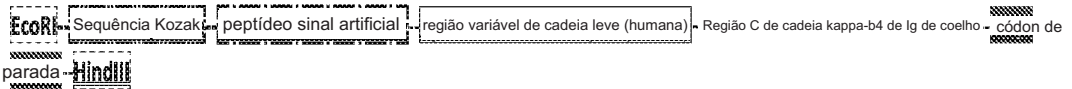
Sequência de cadeia pesada : 461aa

MGWSCIILFLVATATGVHSDVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNLHWVKQAPGQGLEWIGAIYPNGGDTSYKQKFRGRATL
 ADTSTSTVYMEISSLRSEDSAVYYCARGETARATFAYWGQGLVTVSSGGQKAPSVEFLAPCCGDTSSSVVILGCLVKGYLPEPVTVV
 WNSGTLTNGVTRTFPSVQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVHPAINTKVDKTPVASTCSKPTCPPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSDPDPEVQFTWYIINNEQVRTARFPLREQQFNSTRVVSITLPIAHEDNLRCKEFKCKVHNKALPAPTEKTIKSRARGQ
 PLEPKVYTMGPPREELASRSVSLTCMINGFYPSDISVEREKNGKAHDNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSENQRGDFVTCGVNHEA
 LHNHYTQKSISRSRSGF

Sequência de genes : 1410bp (otimização de códon para HEK293)

GAATTCGGCCGCCACCATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACCGGCGTGCACACTCTCAAGTTCAGCTCGTT
 CAGTCTGGCGCGAGGTTCTGAAACCTGGCGCCTCTCTGGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCGGCTACAACATCCA
 CTGGGTCAAGCAGGCCCCCTGGACAGGACTCGAATGGATGGAGCCATCTATCCCGGCAACGGCGACACCAGTACAAGCAGAAGTCC
 GGGGCAGAGCCACTGACCGCCGATACAAGCACCAGCAOCCGTGTACATGGAAGTGGAGAGCCCTGAGAAGCGGAGGACAGCGCGTGTAC
 TATTGGCCAGAGGCGAAACAGCCAGAGCCACCTTTGCCATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTTAGCTCTGGACAGCCAAAGGC
 TCCAGGCTGTTCCCTCTGGGCTCCTGCTGGGGATACCCCTAGCAGCACAGTGAACATGGGCTGTCTGCTCAGGGCTACTGCTG
 AACCTGTGACCGTGTGCTGABTAGCGCCGCCCTGACCAACCGCGTGGGACATTTCTTACCGCTCAGACACAGCAGCGCGCTGTACTCT
 CTGAGCGCGTGGCTGTCTGTGACCAAGGCTCTCAGCCCTGACACCTGCAATGTTGGCCATCCTGCCACCACACCAAGGTSAGCRAAAC
 CCGTGCCTCCCTCCACCTGTAGCAAGGCCCATGTCCTCCACAGAGCTGTGGAGGCCCCCTCCGCTTTATCTTCCACCTTAGCCTA
 AGGACACCTGTATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGAACCTGCGTGGTGGACGTGTCCGAGGATGATCTGTAGGTGCAGTTCACCTGG
 TACATCAACAAGGAGCAAGTGGGACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTORACAGCACCATTCAGAGTGGTGTACCTGCC
 TATGCCCTCAGGAGATGGCTGCCGGCBAAGAGTTCAGTGCAGGTTGACAAACBAGGCCCTGCCCTGCTCTATCGAGAAACCCATCT
 CCAAGGCCAGAGGCCAGCCACTGAAACCCAAAGGTGTACCAATGGGCCCTCCAAAGAGGAACTGTCCAGCAGATCCGCTGTCTGACC
 TGCATGATCAACGGCTCTTACCCBGGCAGATCAGCGTGGAAATGGGAGAAGBATGGORAGCCGAGGACACTACBAGCAACCCCTGC
 CGTCTGGATAGCCAGCCAGCTACTTCTGTACAGCARGCTGAGCGTCCACCTCTGATGCCAACCGGGAGATGTTTACTCTGCA
 GCGTGTATGCAGGCGCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCAGCAGGTCCCCAGGCAAAAGCTTAAAGCTT

Cadeia leve de comprimento total de Mers67:



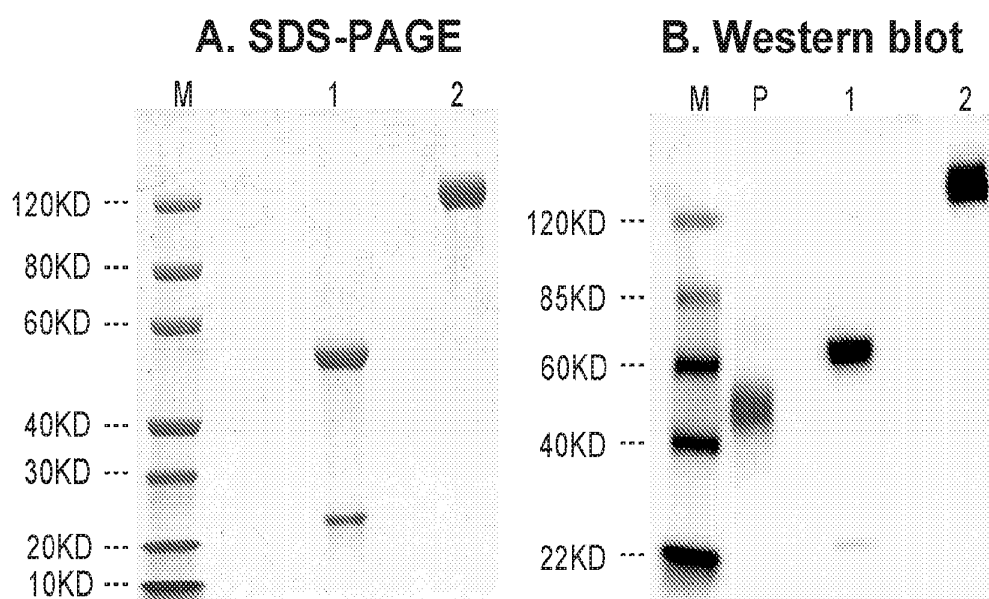
Sequência de cadeia leve : 230aa

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDIGNFLRWYQOKPKRTYKVELIYYTSSLYSGVPSRFSGSGSGTD
 YTLTISSLOPEDFAFYFCOYSKLPITFGQGTKLELIRDPVAVPTVLIFFPADQVATGVTIIVCVANKYFPDVIIVTWEVDGTTQTGIE
 NSKTPQNSADCTYNLSSITLITSTQYNHKEYTCKVTGTTSVVQSFNRGDC

Sequência de genes : 717bp (otimização de códon para HEK293)

GAATTCGGCCGCCACCATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACCGGCGTGCACAGCGATATTCAGATGACA
 CAGAGCCCAGCAGCCTGTCTGCCCTCTGTGGGAGACAGAGTGCACCTACCTGTAGCGCCAGCCAGGATATCCGCAACTCTCTGAACTG
 GTATCAGCAGAAACCCGGCAAGACCTGTAAGGTGCTGATCTACTACACCTCCAGCCCTGTACAGCGGCGTCCCGCAGAGATTTCTGGCA
 GCGGCTCTGGCACCCACTACACCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAAGCTG
 CCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAGCTGGAAGTGAAGAGGGATCTCTGTGCTCCACCGTGCCTGATTTTTCCACAGCCGCGATCA
 GGTGGCCACTGGCACACTGACAAATCGTGTGGTGGCCAAACAAGTACTTCCCGACCTGACCGTGCACCTGGGAAGTGGATGGCACCACAC
 AGACCAACAGCATCCAGAACAGCAAGACCCCTCAGAACAGCGCGACTGCACCTACAACCTGAGCAGCACCCCTGACACTGACCCAGCACA
 CAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGTAAGTCAACCCAGGGCACAACAGCGTGGTGCAGAGCTTCAACBAGAGCGAATTCAGCTTAAAGCTT

FIG. 2



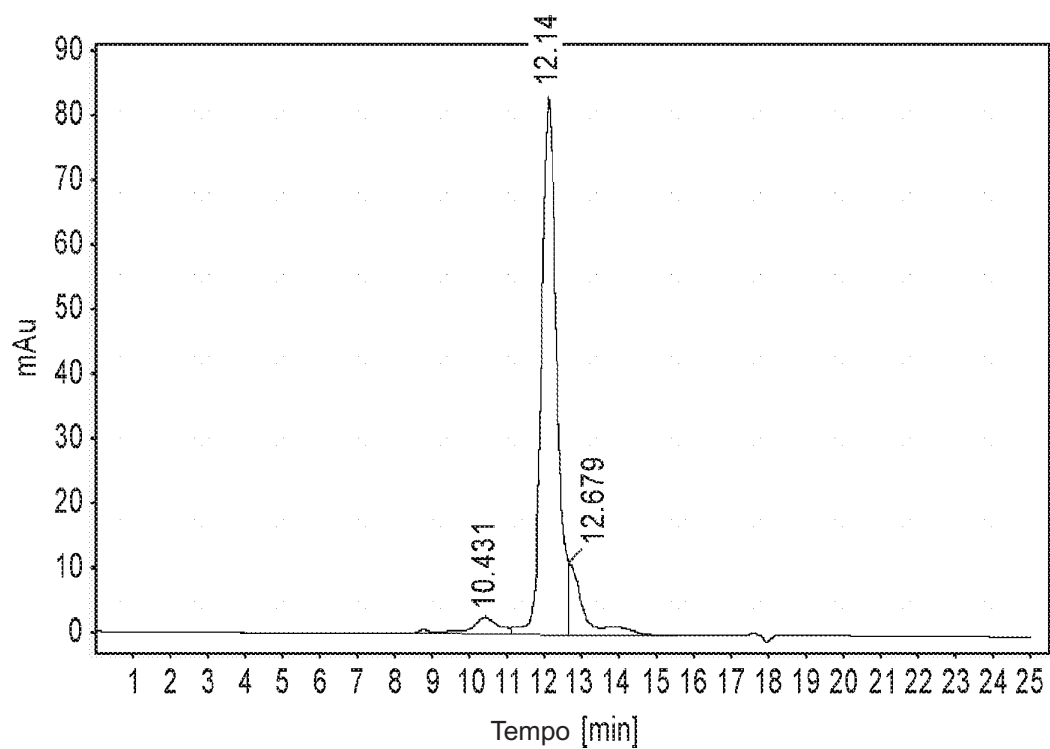
Faixa M : marcador de proteína

Faixa 1 : condições redutoras

Faixa 2 : condições não redutoras

Faixa P: IgG de soro de coelho (Sigma, N° de catalisador 15006)
como controle positivo

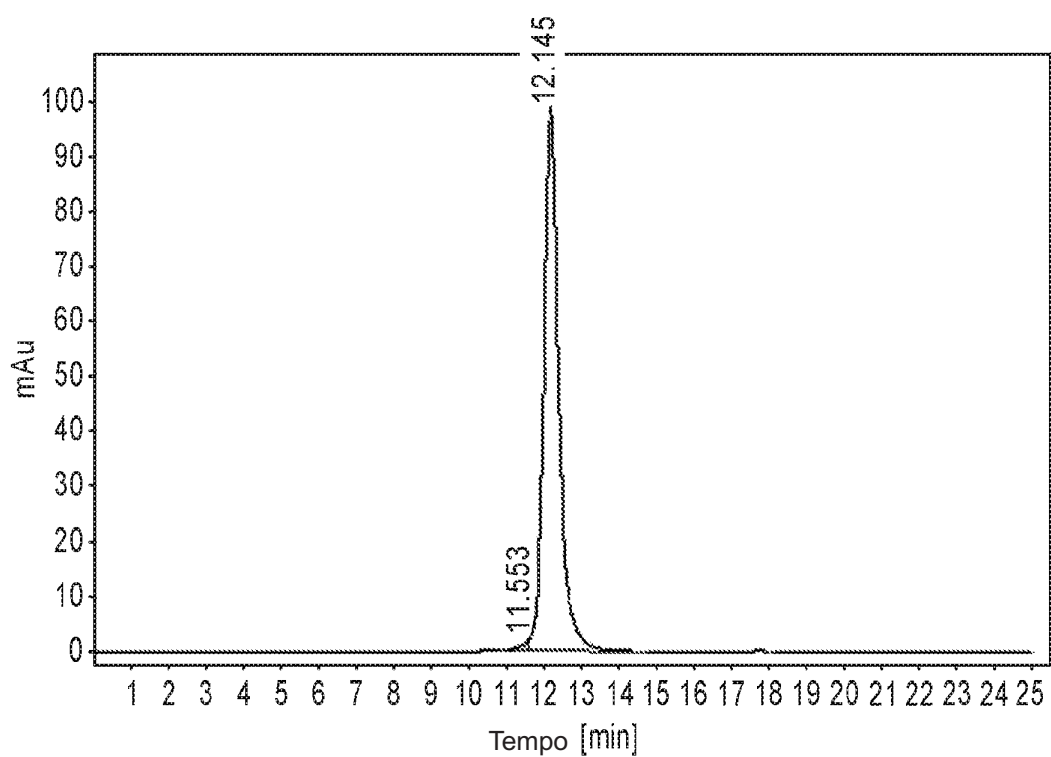
FIG. 3A



Sinal : VWD1 A, Comprimento de onda =280 nm

TR [min]	Altura	Largura [min]	Área	% de área
10.431	2.5755	0.8921	137.8544	4.9464
12.140	82.9476	0.4726	2352.0483	84.3939
12.679	11.0842	0.4467	297.0854	10.6597
		Soma	2786.9881	

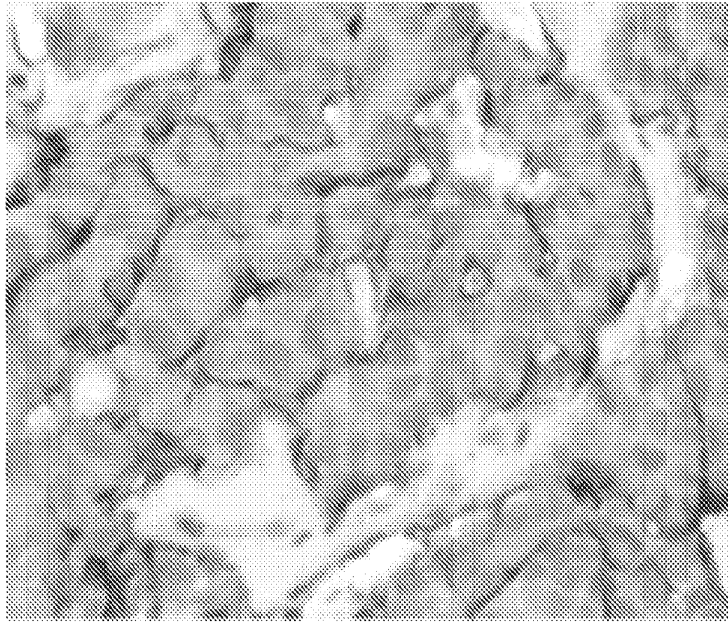
FIG. 3B



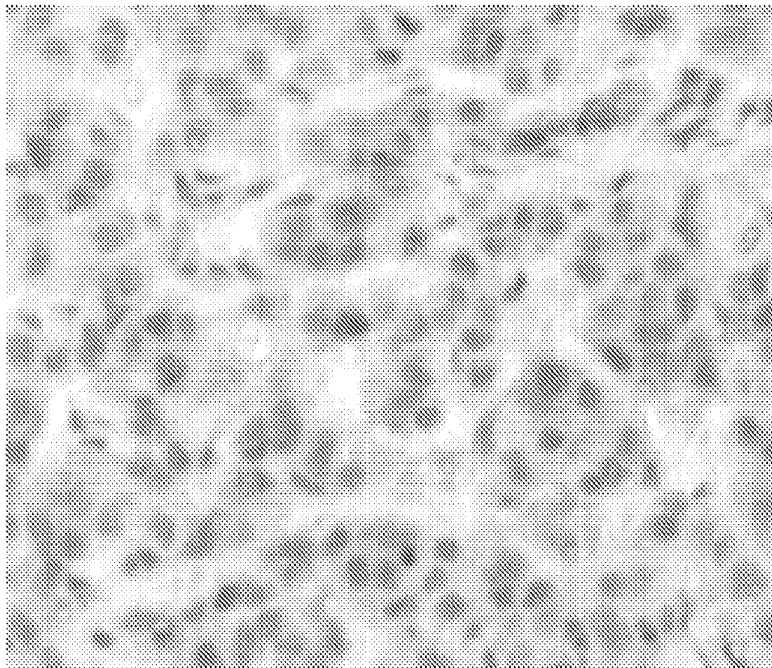
Sinal : VWD1 A, Comprimento de onda =280 nm

TR [min]	Altura	Largura [min]	Área	% de área
11.553	1.8725	0.2489	27.9661	0.9941
12.145	98.6371	0.4706	2785.2646	99.0059
		Soma	2813.2308	

FIG. 4



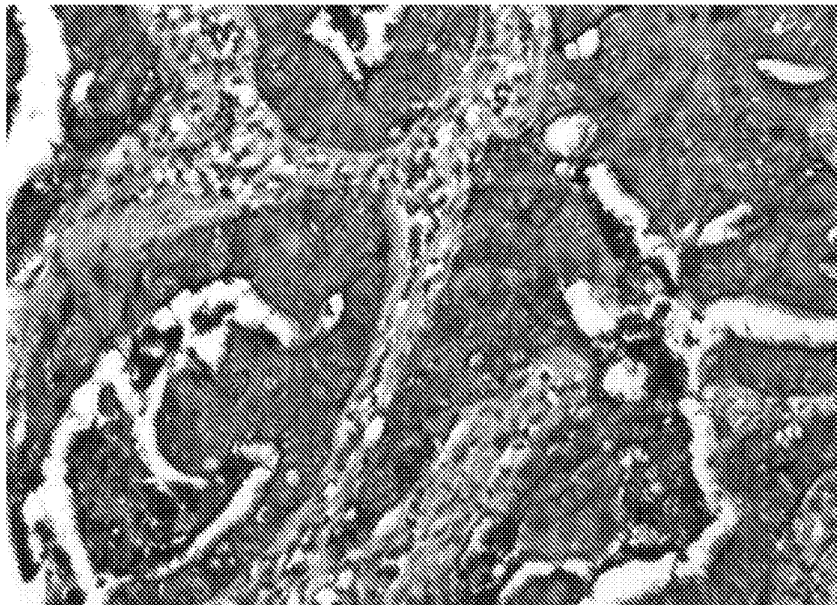
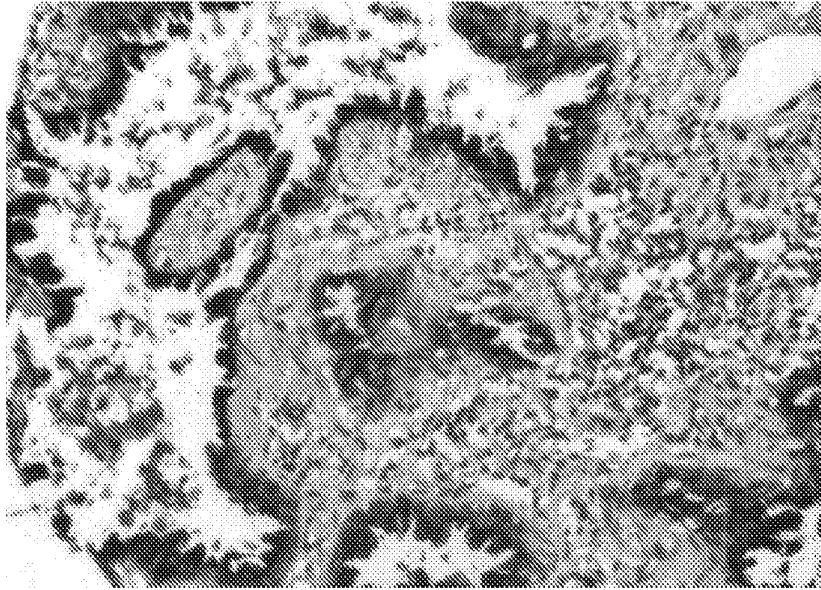
OVCAR3

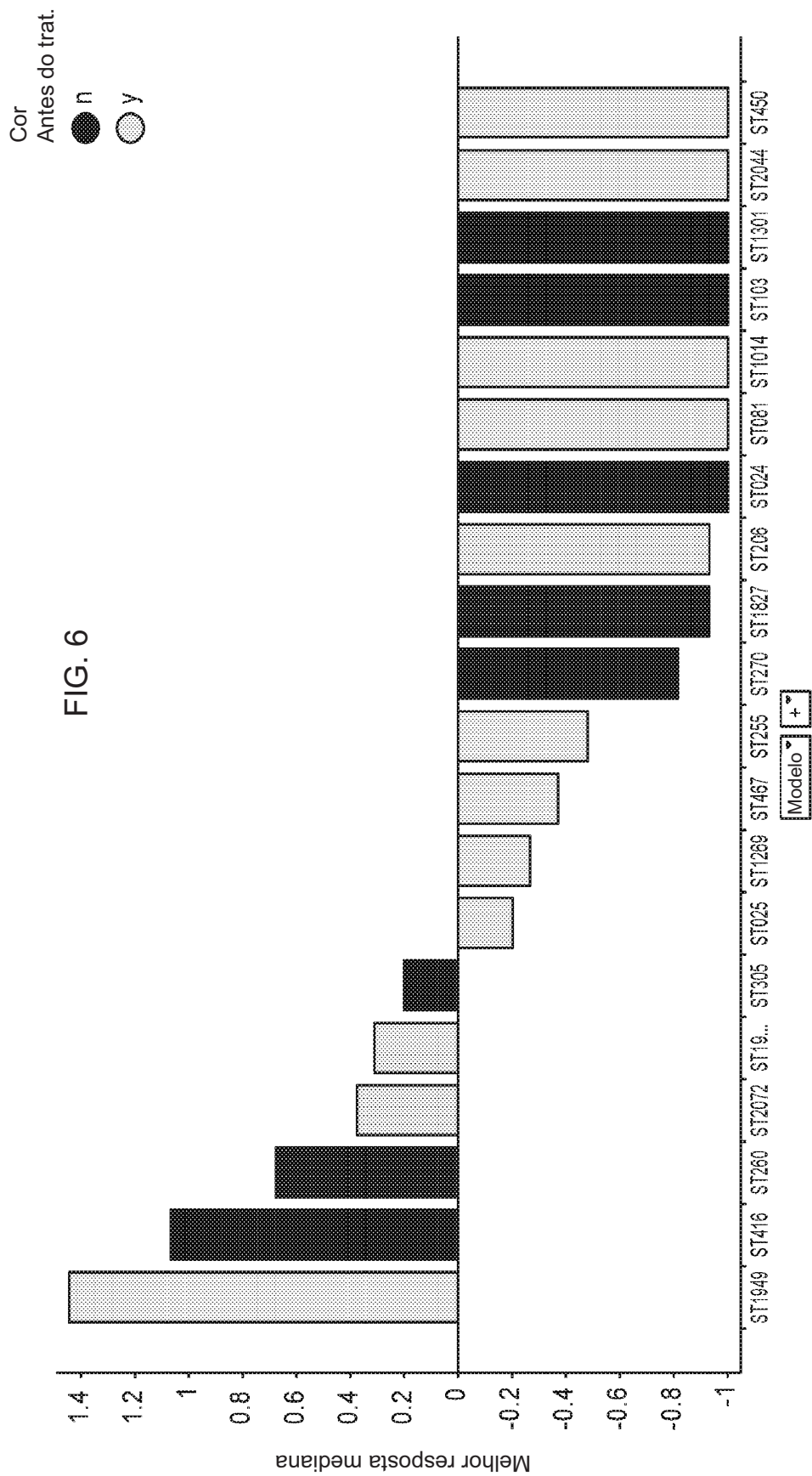


JIMT-1

6/22

FIG. 5





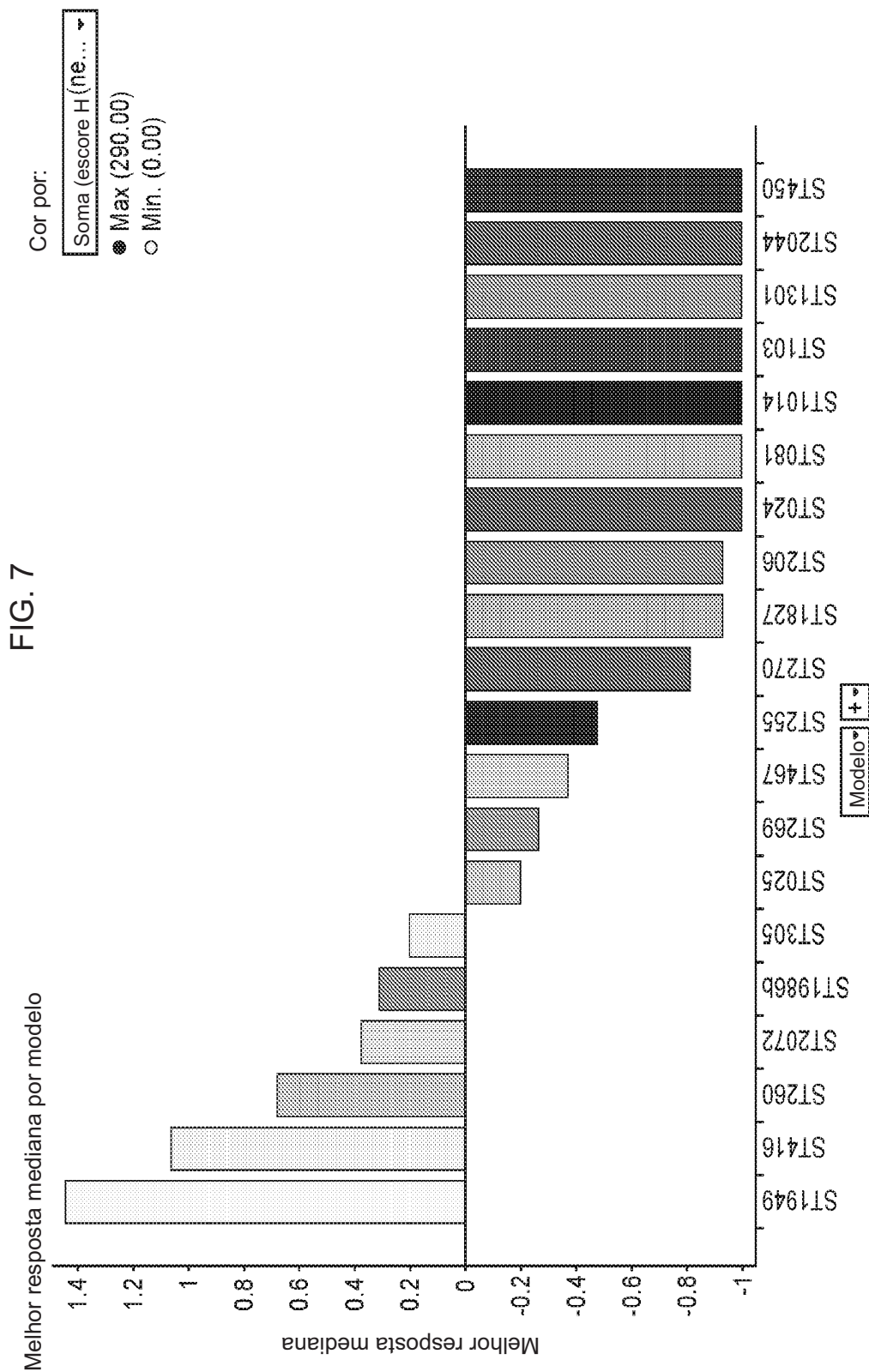
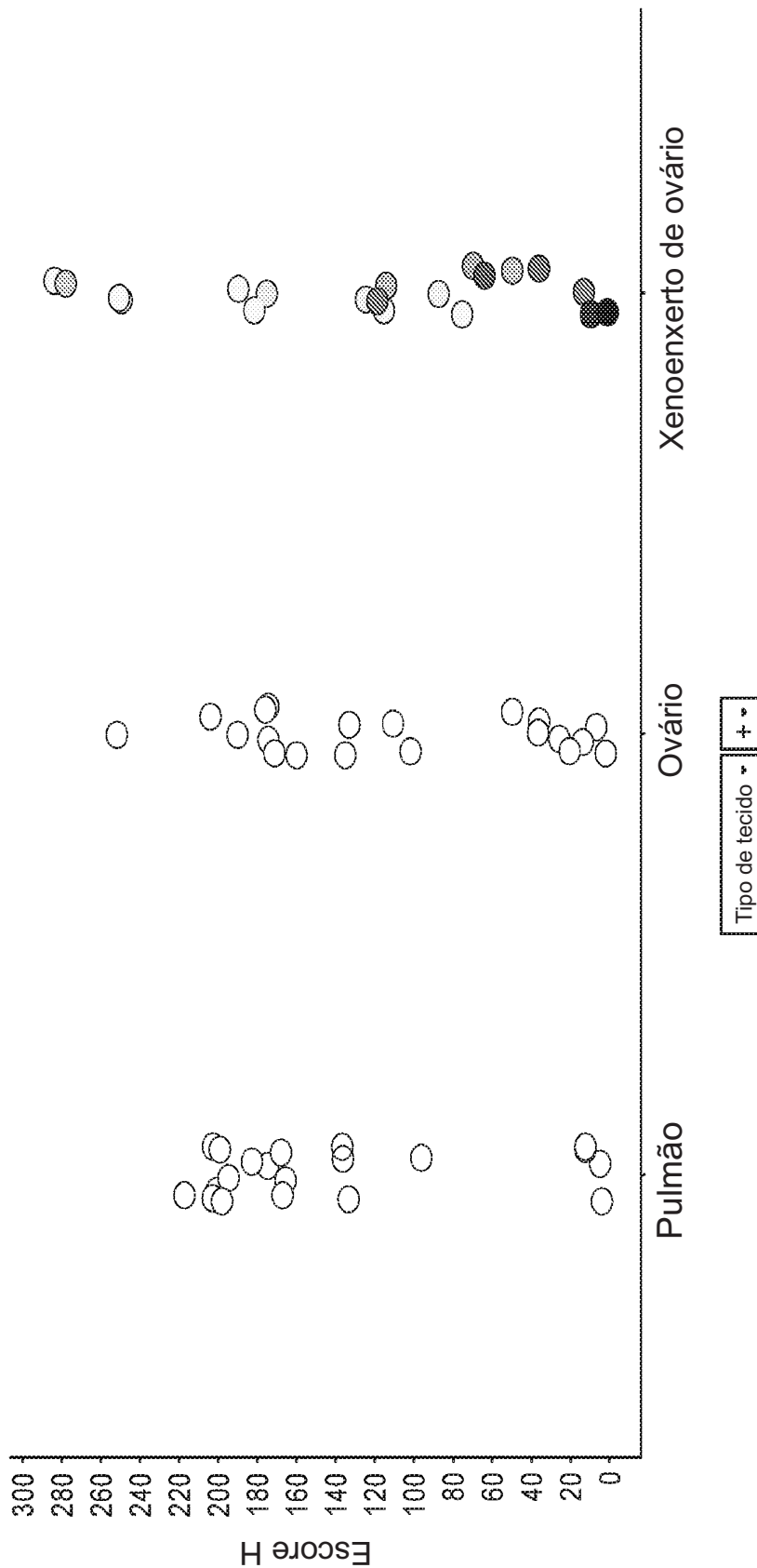
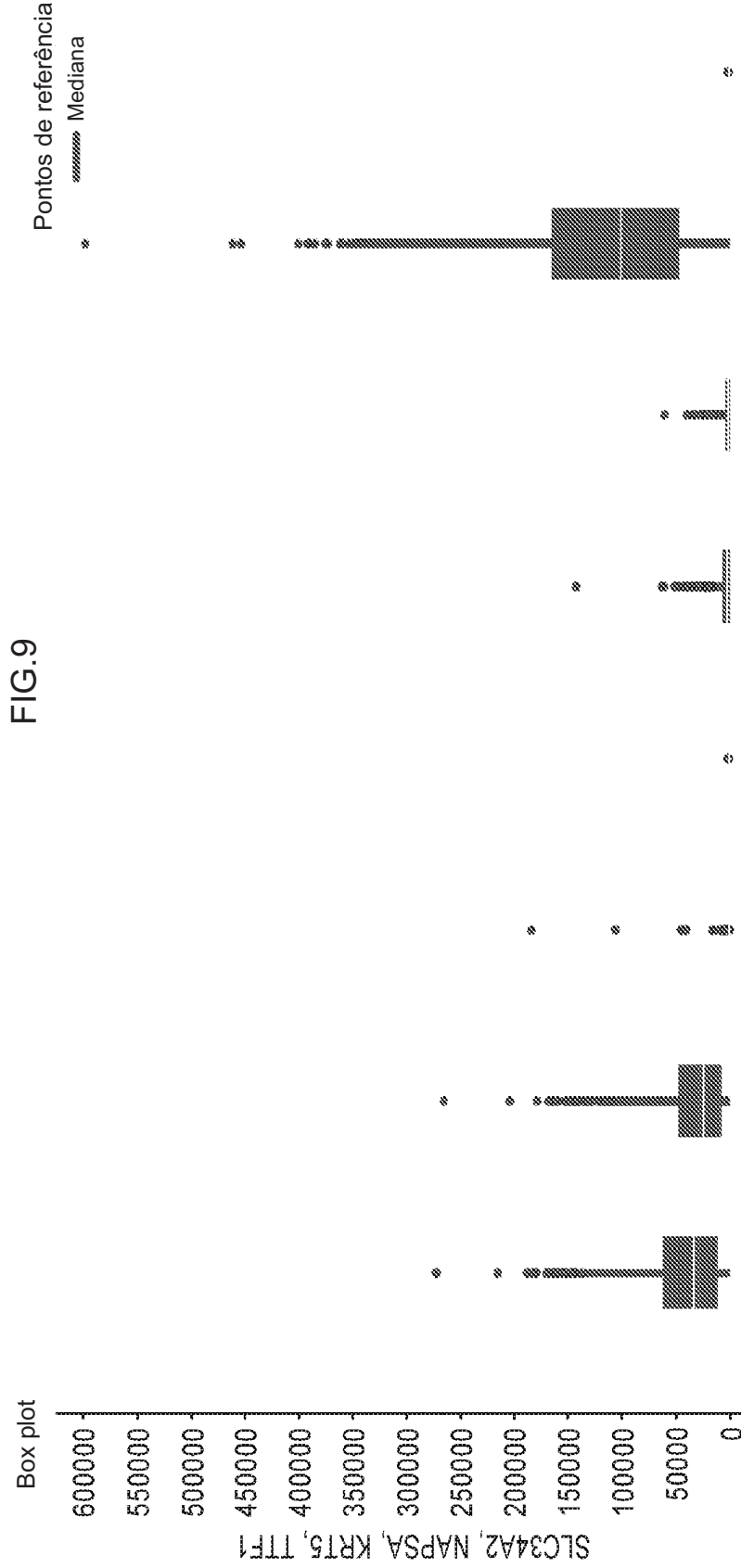


FIG. 8





	ACA				SCC			
	SLC34A2	NAPSA	KRT5	TTF1	SLC34A2	NAPSA	KRT5	TTF1
Contagem	517	517	517	517	501	501	501	501
Mediana	32670	24352.3	40.6455	301.429	1925.63	814.297	100390	334.852
Valores discrepantes	20	31	75	20	41	51	19	15

Coluna 6

FIG.10

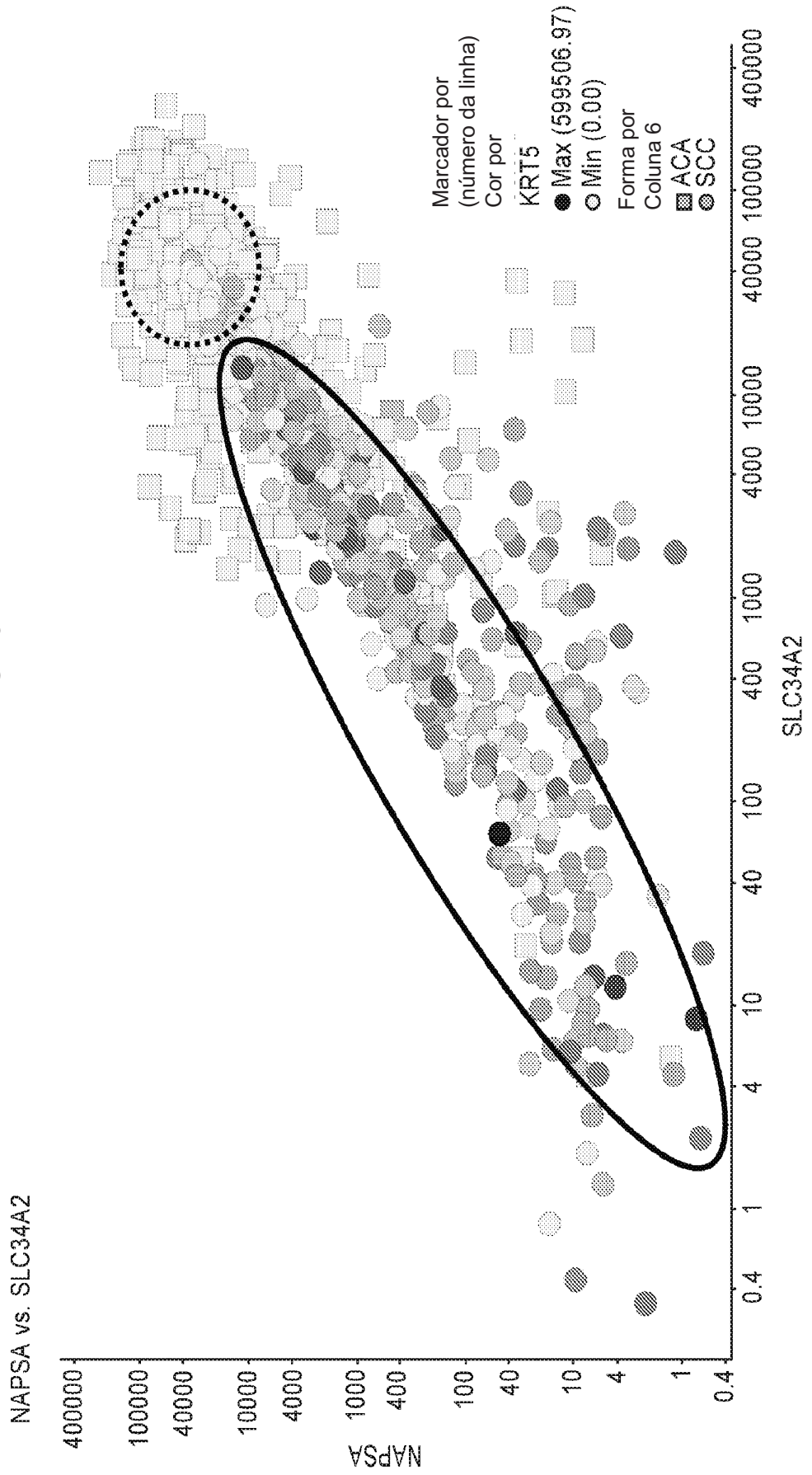


FIG.11

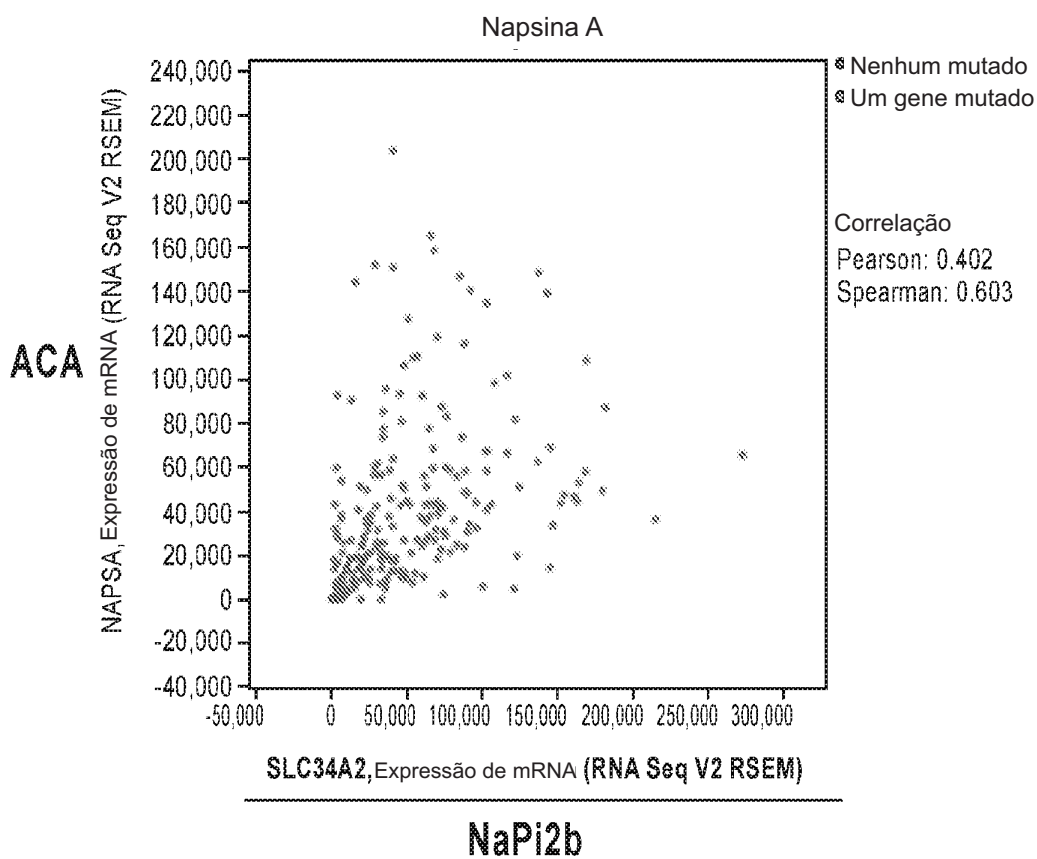
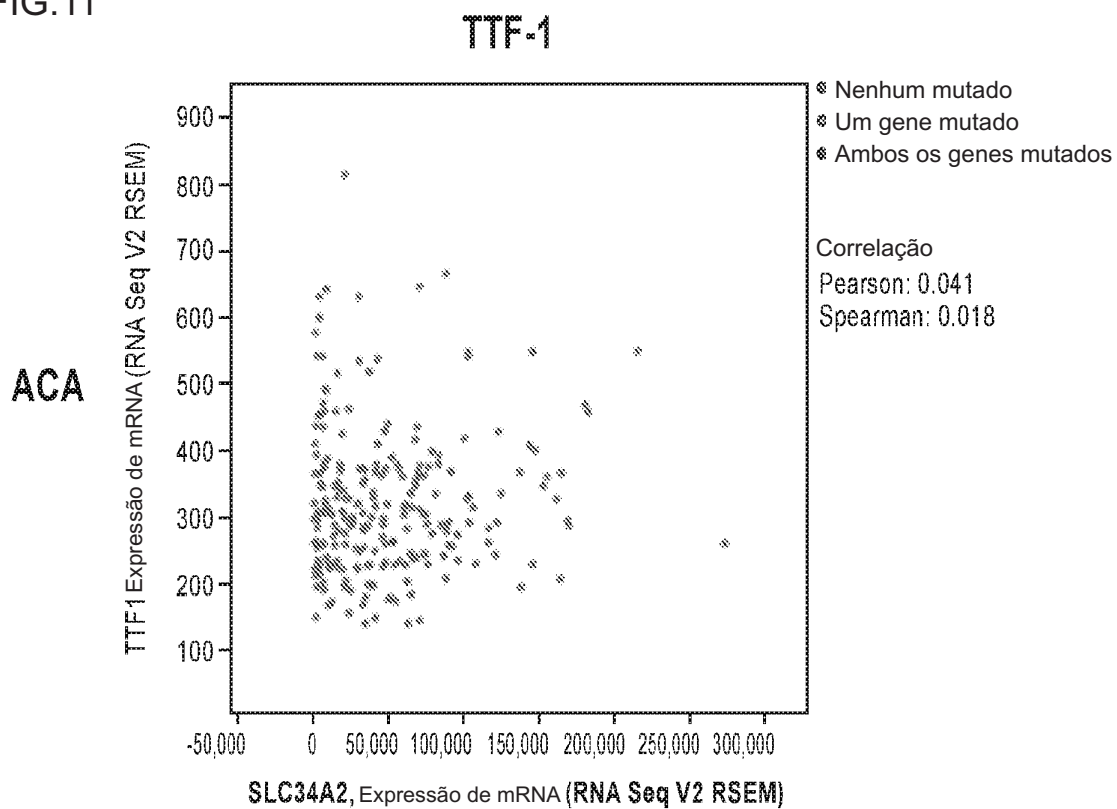


FIG.11 (continuação)

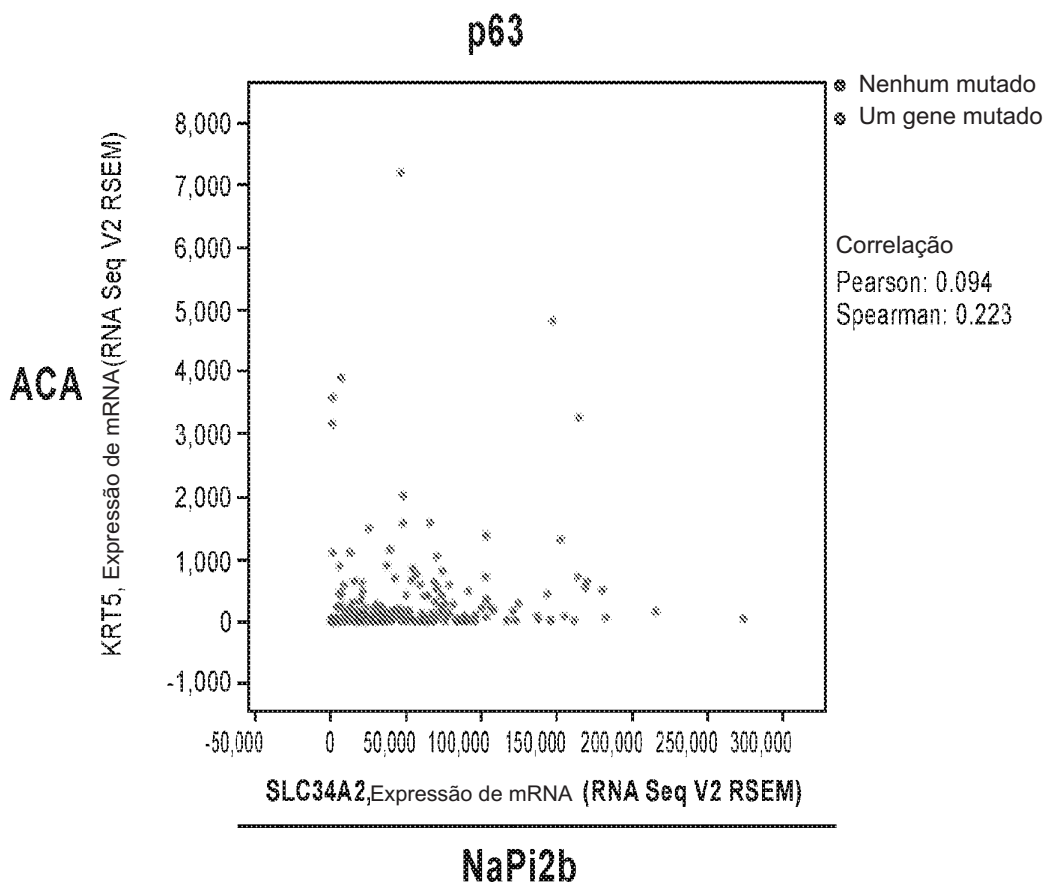
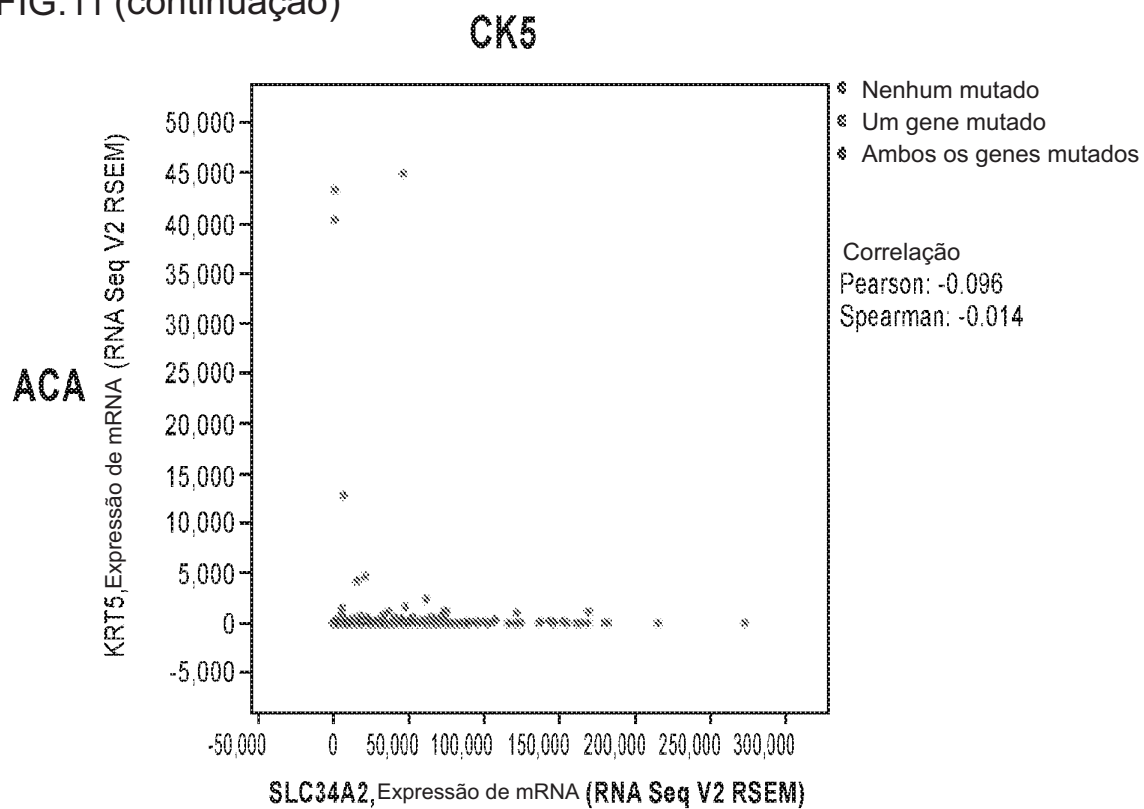


FIG.11 (continuação)

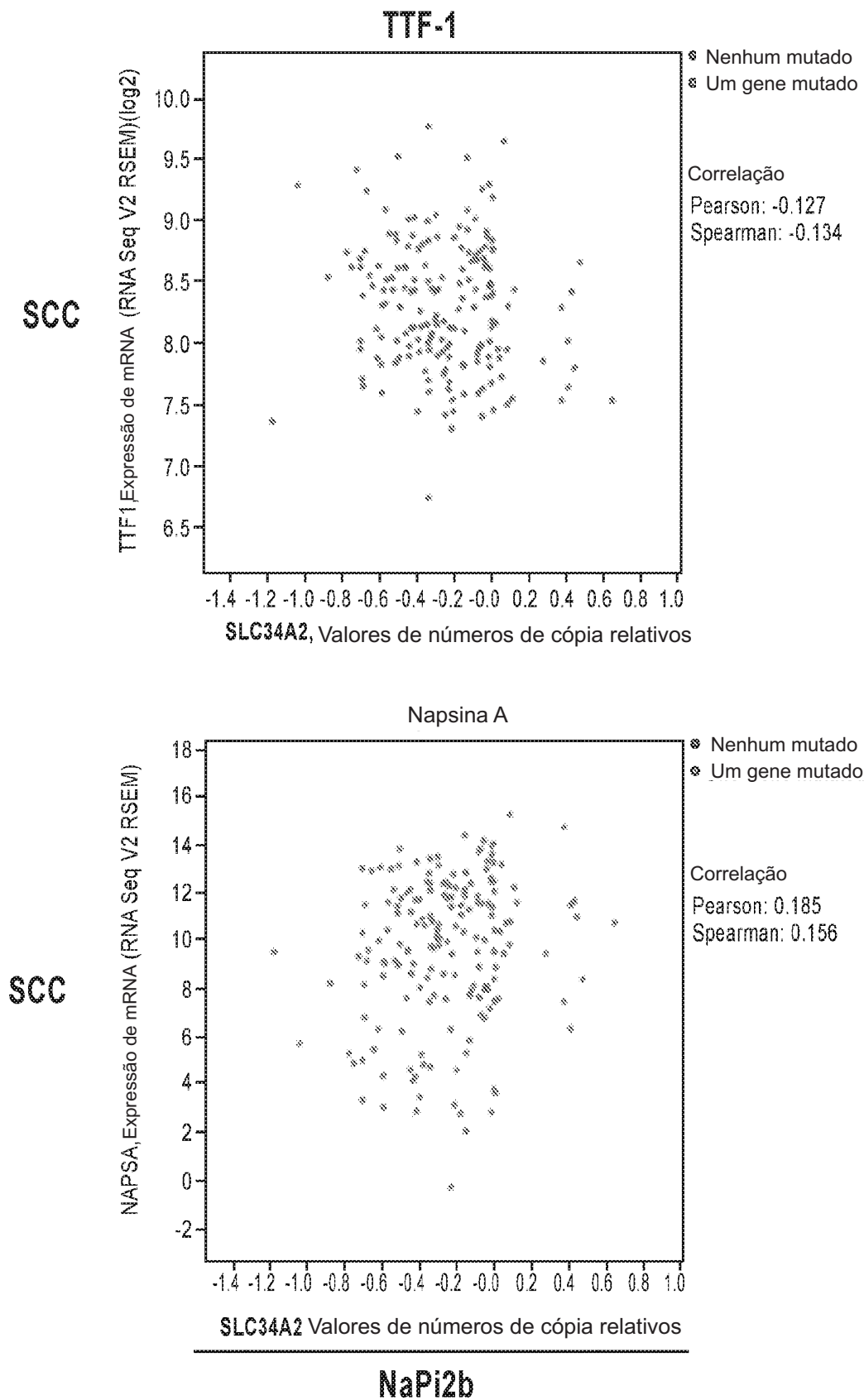


FIG.11 (continuação)

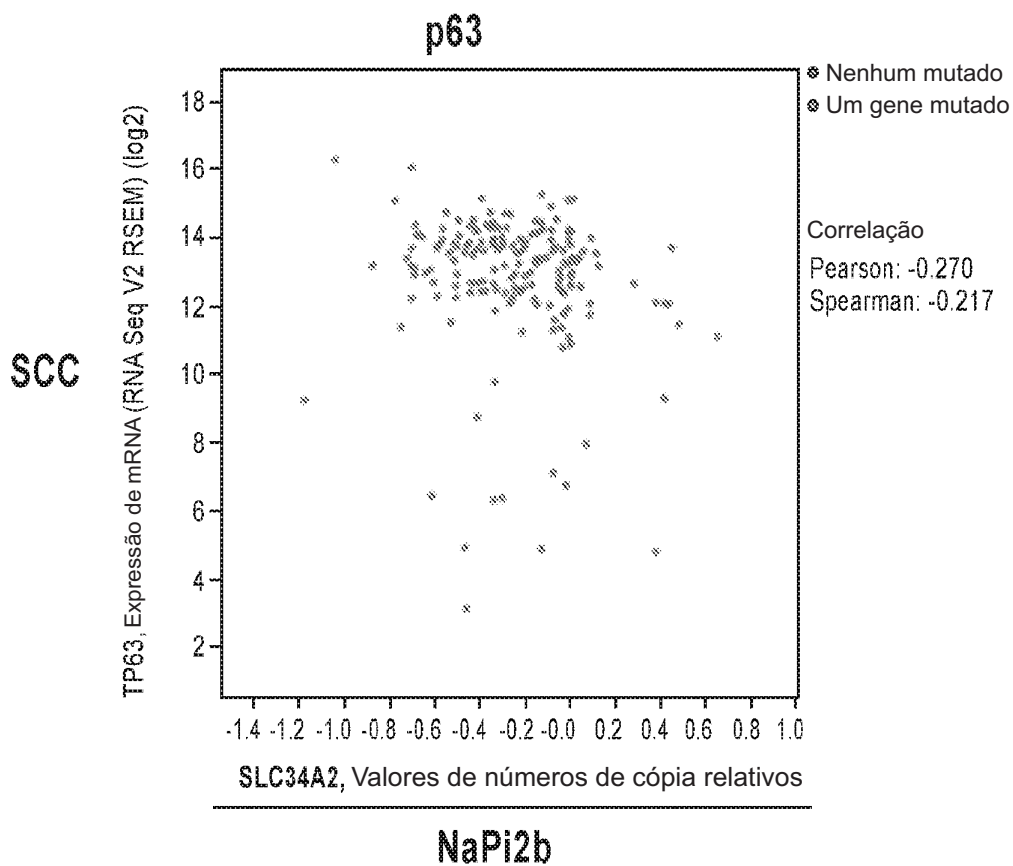
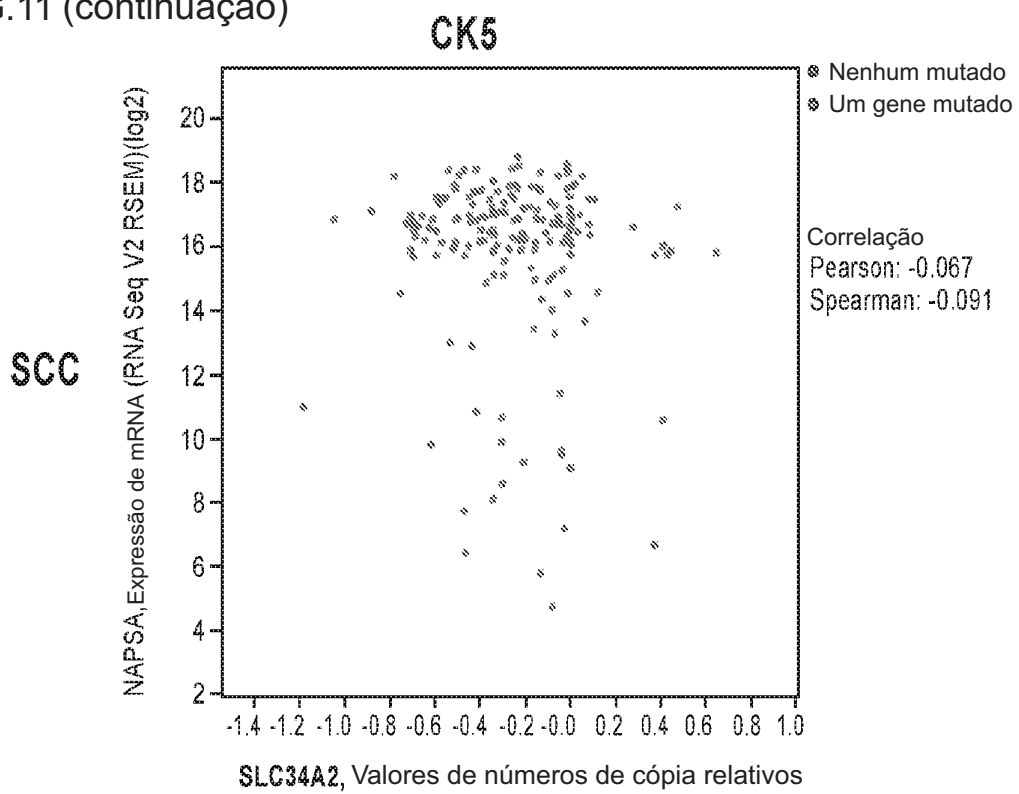


FIG.12

SLC34A2

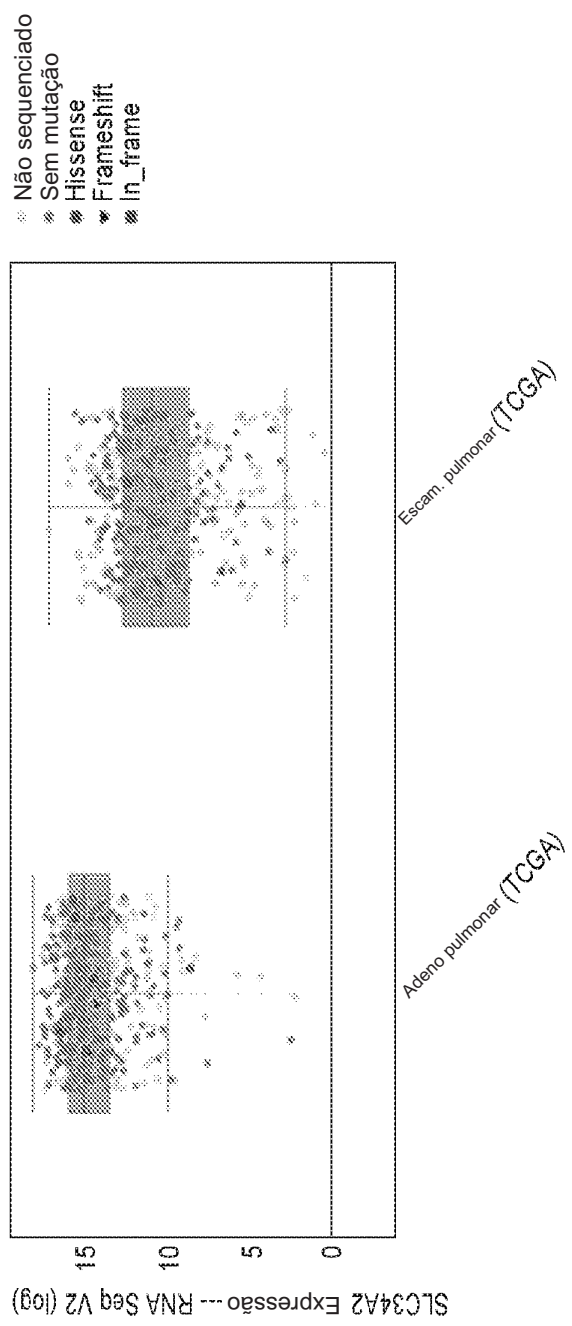
Gene **SLC34A2** Selecionar estudos

Perfil **RNA Seq V2**

Classificado por Estudo de câncer Mediano

Escala log Mostrar mutações

Fazer o download **PDF** **SVG** **Data** como



Expressão de RNA RNA Seq V2(log) = Eixo Y

FIG.12 (continuação)

TTF1

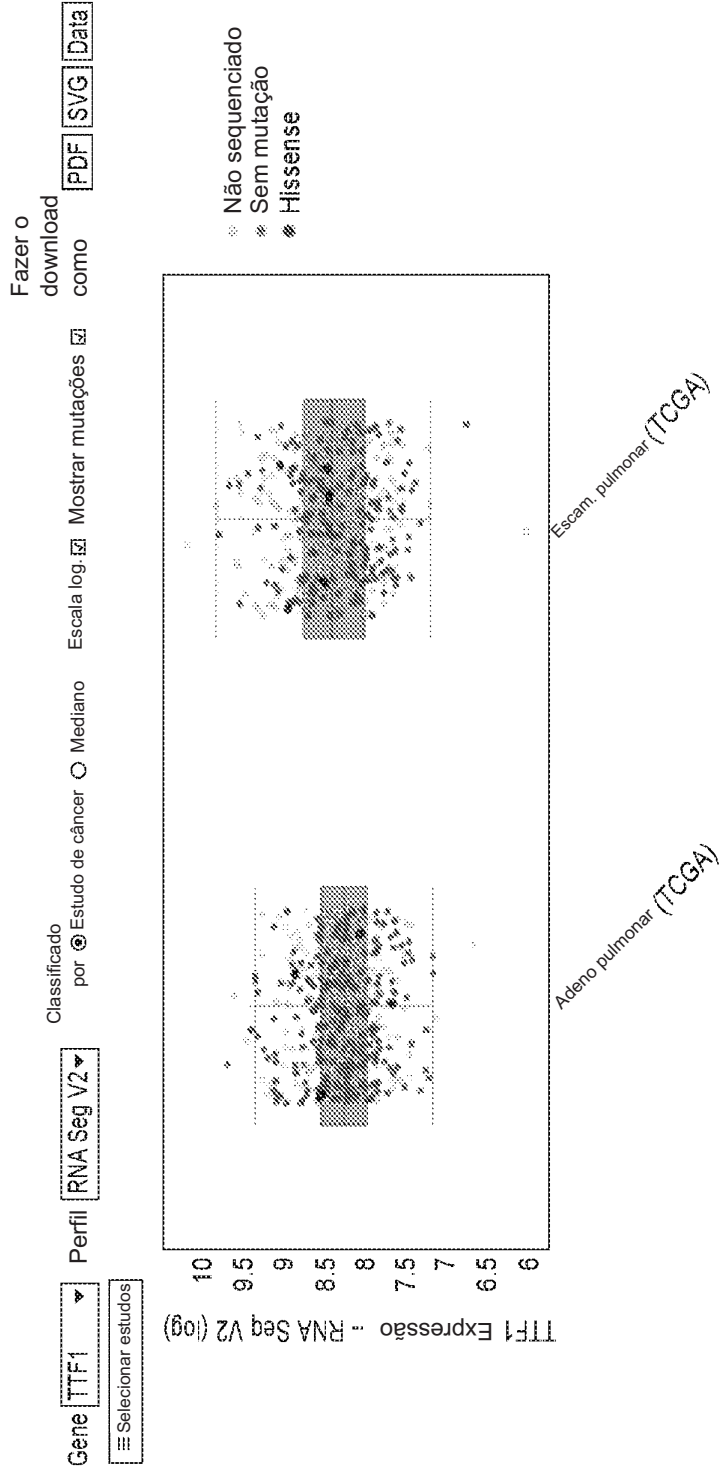


FIG.12 (continuação)

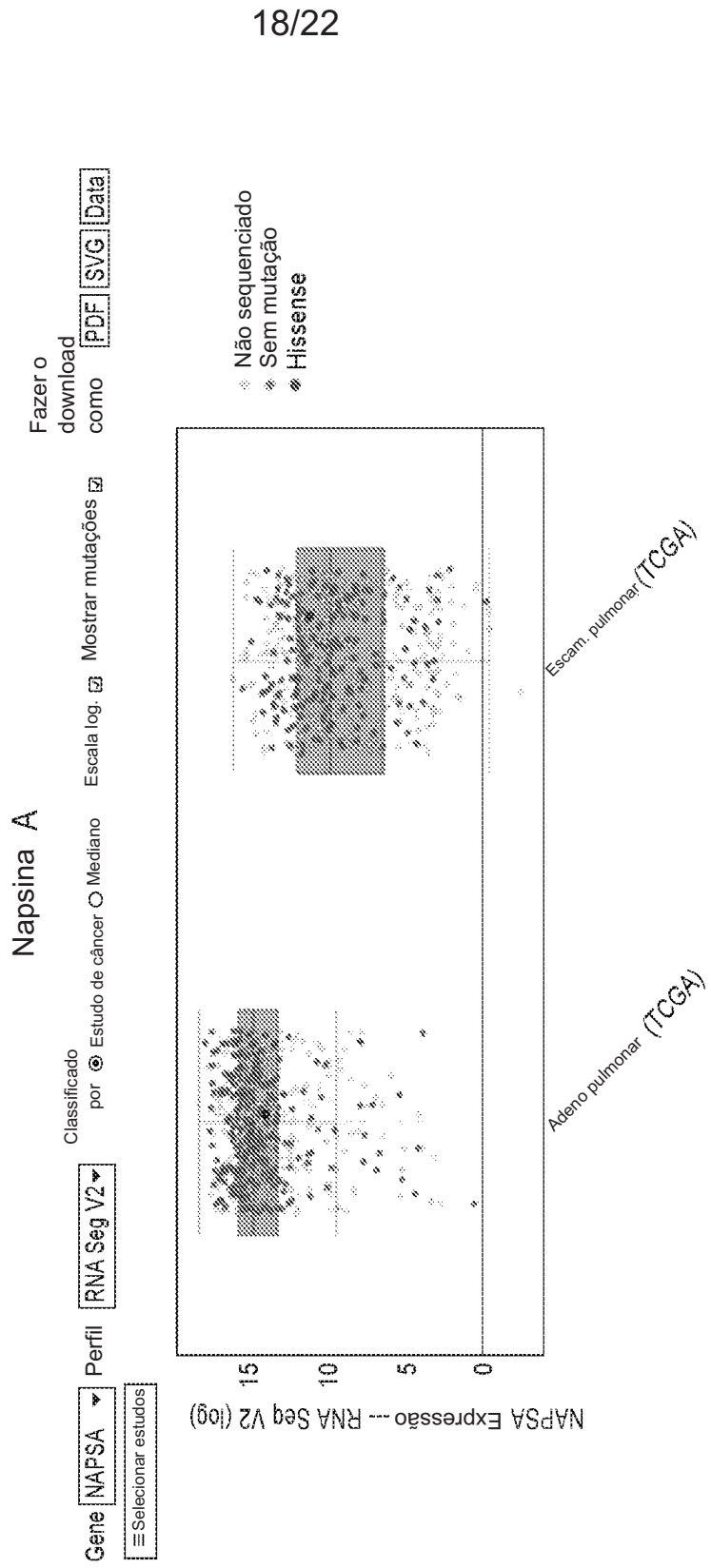


FIG.12 (continuação)

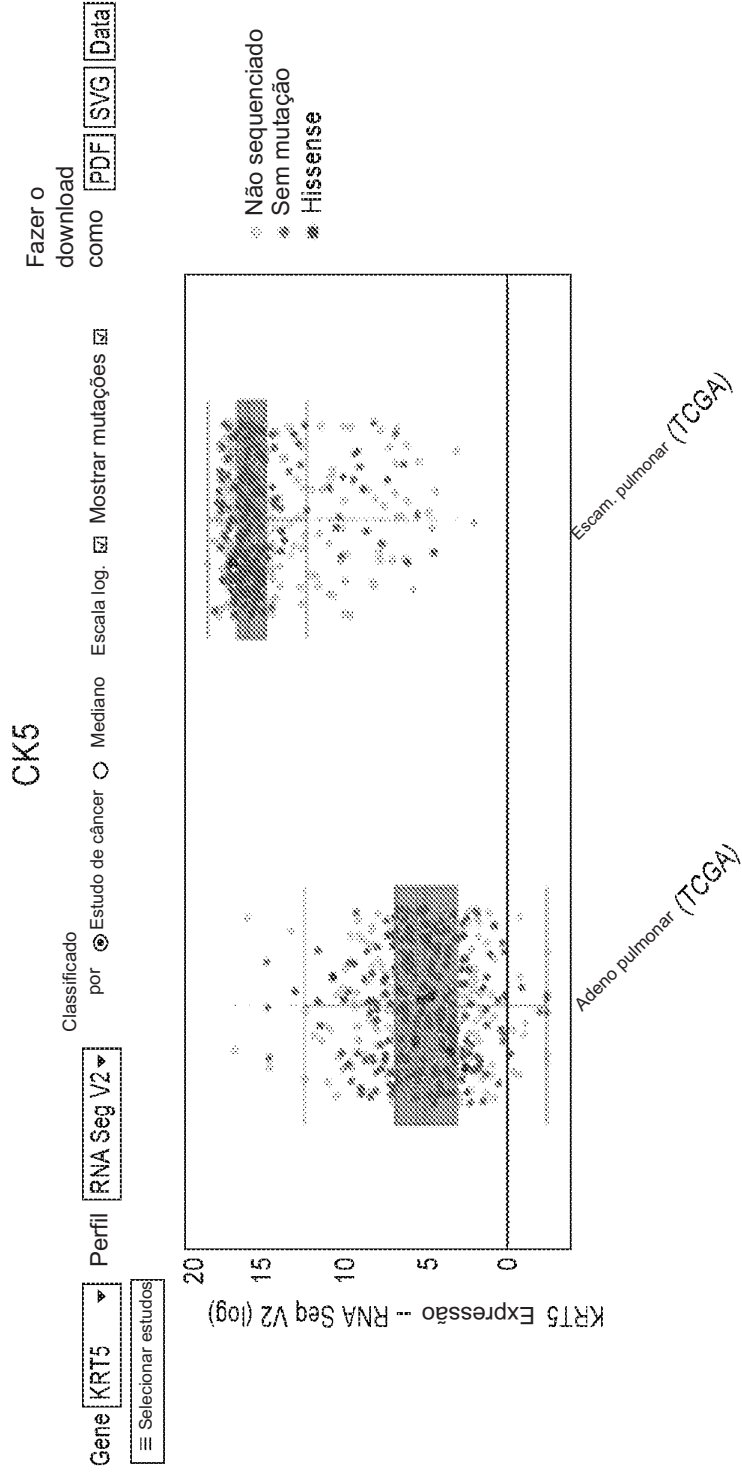


FIG.12 (continuação)

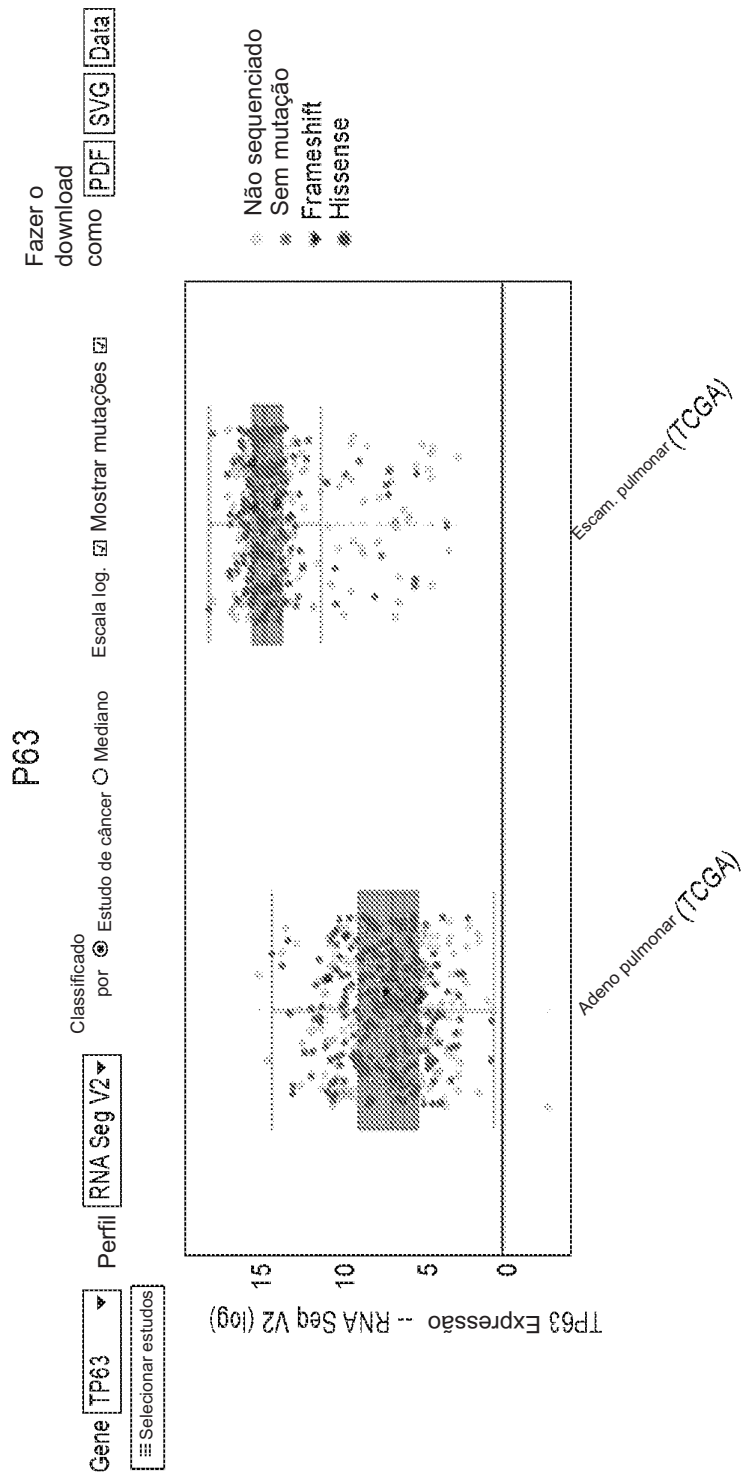
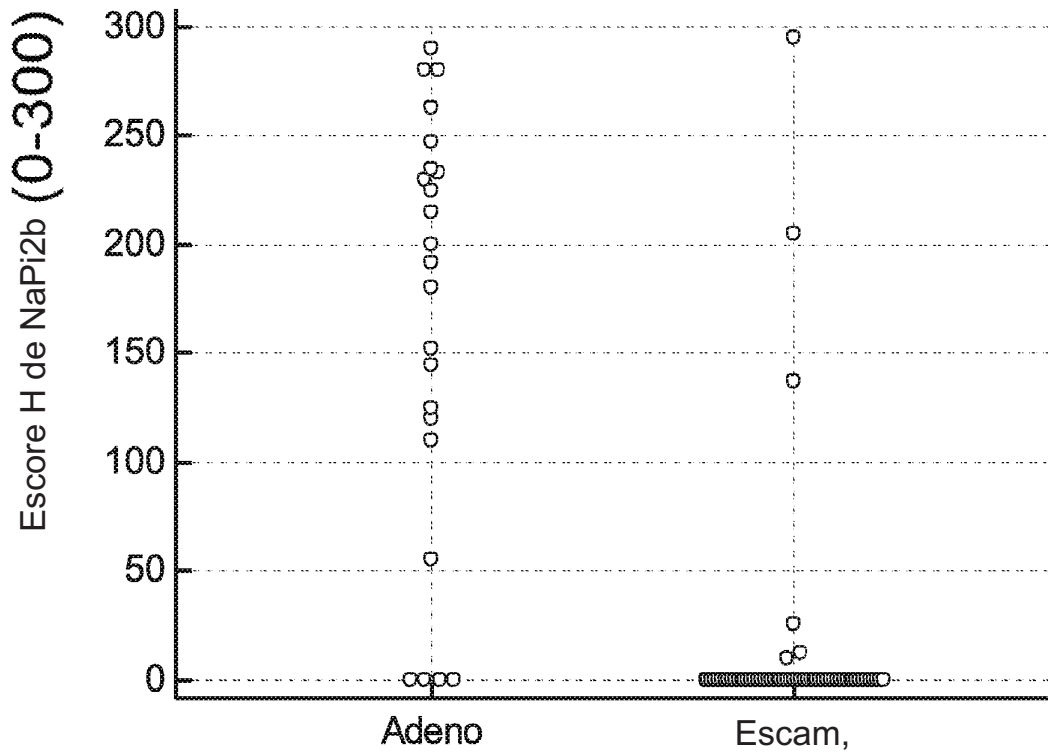
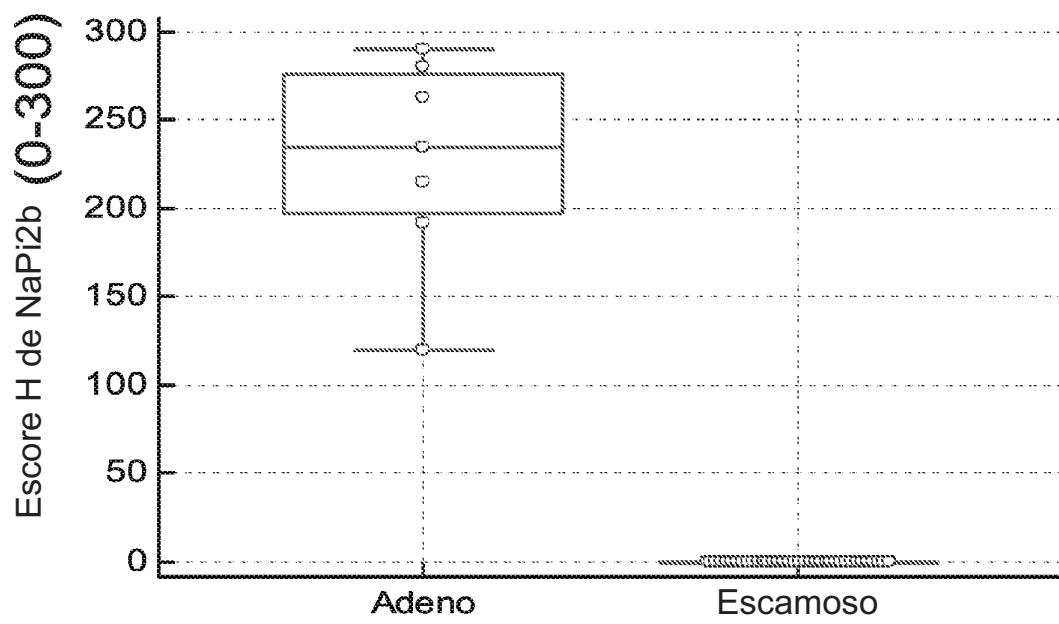


FIG.13



		Positivo	Negativo
Tipo de patologia	Escam,	3	60
	Adeno	19	4
	Outros	4	9
Ponto de corte arbitrário de ≥ 50 Escore H			

FIG.14



RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PREVER A RESPOSTA À TERAPIA DIRECIONADA AO NaPi2B**".

A presente invenção refere-se a reagentes e métodos para prever a capacidade de resposta de um paciente a conjugados de fármaco-anticorpo direcionado ao NaPi2b (por exemplo, conjugados de fármaco-polímero-anticorpo direcionado ao NaPi2b).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P245985.txt
- Data de Geração do Código: 18/03/2020
- Hora de Geração do Código: 15:45:32
- Código de Controle:
 - Campo 1: 324EC59AEBE25F17
 - Campo 2: 53039C7AFB951DA6