

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.12.08	(73) Titular(es): MEDAREX, INC.	
(30) Prioridade(s): 2005.12.08 US 748373 P	ROUTE 206 & PROVINCE LINE ROAD	US
(43) Data de publicação do pedido: 2008.08.20	PRINCETON, NJ 08540	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.04.17 118/2013	(72) Inventor(es): CHIN PAN LI-SHENG LU JONATHAN ALEXANDER TERRETT	US US US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA A PROTEÍNA TIROSINACINASE 7 (PTK7) E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA ANTICORPOS MONOCLONAIS ISOLADOS, PARTICULARMENTE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS, QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A PTK7 COM ELEVADA AFINIDADE. MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO OS ANTICORPOS DO INVENTO, VECTORES DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS PARA EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS DO INVENTO SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS. IMUNOCONJUGADOS, MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS ANTICORPOS DO INVENTO SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS. O INVENTO PROPORCIONA TAMBÉM MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE PTK7, BEM COMO MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE VÁRIAS DOENÇAS, INCLUINDO CANCRO E DOENÇAS INFECCIOSAS, UTILIZANDO ANTICORPOS ANTI-PTK7.

RESUMO

**"Anticorpos monoclonais humanos para a proteína tirosina-
cinase 7 (PTK7) e sua utilização"**

O presente invento proporciona anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos, que se ligam especificamente a PTK7 com elevada afinidade. Moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos do invento, vectores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressão dos anticorpos do invento são também proporcionados. Imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos do invento são também proporcionados. O invento proporciona também métodos para detecção de PTK7, bem como métodos para tratamento de várias doenças, incluindo cancro e doenças infecciosas, utilizando anticorpos anti-PTK7.

DESCRIÇÃO

"Anticorpos monoclonais humanos para a proteína tirosina-cinase 7 (PTK7) e sua utilização"

Antecedentes do Invento

Os receptores tirosina-cinases (RTK) são proteínas de sinalização transmembranares que transmitem sinais biológicos do ambiente extracelular para o interior da célula. A regulação dos sinais de RTK é importante para a regulação do crescimento celular, da diferenciação, do crescimento axonal, do crescimento epitelial, do desenvolvimento, da adesão, da migração e da apoptose (Prenzel et al., (2001), *Endocr. Relat. Cancer* 8: 11-31; Hubbard e Till (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69: 373-98). Sabe-se que as RTK estão envolvidas no desenvolvimento e na progressão de várias formas de cancro. Na maior parte dos cancros relacionados com RTK, houve uma amplificação da proteína receptora em vez de uma mutação do gene (Kobus e Fleming (2005) *Biochemistry* 44: 1464-70).

A proteína tirosina-cinase 7 (PTK7), um membro da família de proteínas receptoras tirosina-cinases, foi isolada pela primeira vez a partir de melanócitos humanos normais e clonada através de RT-PCR (Lee et al., (1993) *Oncogene* 8: 3403-10; Park et al., (1996) *J. Biochem.* 119: 235-9). Separadamente, o gene foi clonado a partir de linhas celulares derivadas de carcinoma do cólon humano e designado cinase de carcinoma do cólon 4 (CCK4) (Mossie et al. (1995) *Oncogene* 11: 2179-84). A PTK7 pertence a um subconjunto de RTK que não têm actividade de tirosina-cinase catalítica detectável mas mantêm a actividade de transdução do sinal e pensa-se que funcione possivelmente como uma molécula de adesão celular.

Verificou-se que o ARNm para PTK7 era expresso variavelmente em linhas celulares derivadas de carcinoma do cólon mas não se verificou ser expresso em tecidos do cólon humano adulto (Mossie et al., *supra*). A expressão de PTK7 foi também observada nalgumas linhas celulares de melanoma e biopsias de melanoma (Easty, et al. (1997) *Int. J. Cancer* 71: 1061-5). Verificou-se que era expressa uma forma de

processamento alternativo em hepatomas e células de cancro do cólon (Jung *et al.*, (2002) *Biochim, Biophys, Acta* 1579: 153-63). Além disso, verificou-se que PTK7 era altamente sobre-expressa em amostras de leucemia mielóide aguda (Muller-Tidow *et al.*, (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 1241-9). Através de imuno-histoquímica, coloração específica de tumores de PTK7 foi observada em cancros da mama, do cólon, do pulmão, do pâncreas, do rim e da bexiga, tal como descrito na Publicação PCT WO 04/17992. WO 2004/017992 descreve PTK7, agentes que interagem com, ou modulam a expressão ou actividade de PTK7, e sua utilização no tratamento de carcinoma. Kyriakos *et al.* (*Cancer Research* 52, Fevereiro de 1992, N° 4, páginas 835-842) descreve o destino de anticorpos ligados à superfície de células tumorais *in vitro*.

Concordantemente, são desejados agentes que reconheçam PTK7, e métodos de utilização de tais agentes.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados, em particular anticorpos monoclonais humanos, que se ligam a PTK7 e que exibem numerosas propriedades desejáveis. Estas propriedades incluem ligação de elevada afinidade a PTK7 humana e ligação a células de tumores de Wilms. São também proporcionados os anticorpos e as composições da invenção para utilização em métodos para tratamento de uma variedade de doenças mediadas por PTK7.

A invenção refere-se a um anticorpo monoclonal humano isolado, ou uma porção de ligação ao antigénio deste, em que o anticorpo:

- a) se liga especificamente a PTK7 humana; e
- b) se liga a uma linha de células de tumor de Wilms tendo o N° de Acesso ATCC CRL-1441 com uma CE₅₀ de 4,0 nM ou menos, num ensaio que compreende a incubação de 1×10^5 células com o anticorpo a uma concentração de partida de 30 µg/ml e diluição em série do anticorpo até uma diluição de 1:10; e
- c) se liga ao mesmo epitopo em PTK7 humana como um anticorpo de referência compreendendo:
 - i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; ou

ii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; ou

iii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Um anticorpo preferido ou porção de ligação ao antígeno deste compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 12;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 16;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 20;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 25;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 31; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 37;

ou

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 14;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 18;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 22;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 28;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 34; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 40;

ou

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 13;

- b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 17;
- c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 21;
- d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 26;
- e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 32; e
- f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 38.

Outros anticorpos preferidos do invento, ou porções de ligação ao antígeno destes, compreendem:

- a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e
 - b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- ou

- a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; e
 - b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
- ou

- a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; e
- b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Os anticorpos do invento podem ser, por exemplo, anticorpos inteiros, por exemplo de um isotipo IgG1 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpos, tais como fragmentos Fab ou Fab'2, ou anticorpos de cadeia simples.

O invento também proporciona um imunoconjugado compreendendo um anticorpo do invento, ou uma porção de ligação ao antígeno deste, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo radioactivo.

Composições compreendendo um anticorpo, ou uma porção de ligação ao antígeno deste, ou imunoconjugado do invento e um

transportador farmacêuticamente aceitável são também proporcionadas.

Moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos, ou as porções de ligação ao antígeno destes, do invento são também englobados pelo invento, bem como vectores de expressão compreendendo tais ácidos nucleicos e células hospedeiras compreendendo tais vectores de expressão.

É também proporcionado um método *in vitro* para preparação de um anticorpo do invento que compreende a expressão do anticorpo numa célula hospedeira do invento e o isolamento do anticorpo a partir da célula hospedeira.

Além disso, é aqui divulgado um ratinho transgénico compreendendo transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina humana, em que o ratinho expressa um anticorpo do invento, bem como hibridomas preparados a partir de um tal ratinho, em que o hibridoma produz o anticorpo do invento.

Ainda noutro aspecto, o invento proporciona um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, do invento para utilização num método de tratamento ou prevenção de um cancro caracterizado por crescimento de células tumorais expressando PTK7. O cancro pode ser cancro do cólon (incluindo cancro do intestino delgado), cancro do pulmão, cancro da mama, cancro do pâncreas, melanoma (p. ex., melanoma maligno metastático), leucemia mielóide aguda, cancro do rim, cancro da bexiga, cancro do ovário ou cancro da próstata. Exemplos de outros cancros incluem cancro renal (p. ex., carcinoma de células renais), glioblastoma, tumores cerebrais, leucemias crónicas ou agudas incluindo leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia de células T do adulto (T-ALL), leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas (p. ex., linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma primário do SNC, linfoma de células T, linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), linfomas de células T cutâneas, linfomas nodulares de células pequenas clivadas, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), cancros linfomas

foliculares enteroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas de células grandes difusas da linhagem B, linfoma de células T semelhante a linfadenopatia angioimunoblástica (AILD) e linfomas baseados em cavidades corporais associadas a VIH), carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (p. ex., tumor de Schmincke), doença de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e outros linfomas de células B, carcinomas nasofaríngicos, cancro ósseo, cancro da pele, cancro da cabeça ou do pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, cancro uterino, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro testicular, cancro uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula tiróide, cancro da glândula paratiróide, cancro da glândula supra-renal, sarcoma de tecidos moles, cancro da uretra, cancro do pênis, tumores sólidos da infância, cancro da bexiga, cancro do rim ou uréter, carcinoma do pêlviz renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), angiogénese tumoral, tumor do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma hipofisário, carcinoma epidermóide, cancro de células escamosas, cancros ambientalmente induzidos incluindo aqueles induzidos pelo amianto, p. ex., mesotelioma e combinações dos referidos cancros.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 41) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) da região variável de cadeia pesada dos anticorpos monoclonais humanos 3G8 e 3G8a. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 15) e CDR3 (SEQ ID NO: 19) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V, D e J estão indicadas.

A Figura 1B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 45) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 3G8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) e CDR3 (SEQ ID NO: 35) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 1C mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 46) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 3G8a. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) e CDR3 (SEQ ID NO: 36) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 2A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 42) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 4D5. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 16) e CDR3 (SEQ ID NO: 20) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V, D e J estão indicadas.

A Figura 2B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 47) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 4D5. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 31) e CDR3 (SEQ ID NO: 37) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 3A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 43) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) da região variável de cadeia pesada dos anticorpos monoclonais humanos 12C6. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 17) e CDR3 (SEQ ID NO: 21) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V, D e J estão indicadas.

A Figura 3B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 48) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12C6. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 32) e CDR3 (SEQ ID NO: 38) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 3C mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 49) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12C6a. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 27), CDR2 (SEQ ID NO: 33) e CDR3 (SEQ ID NO: 39) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 4A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 44) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 7C8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 18) e CDR3 (SEQ ID NO: 22) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V, D e J estão indicadas.

A Figura 4B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 50) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 7C8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 28), CDR2 (SEQ ID NO: 34) e CDR3 (SEQ ID NO: 40) estão delineadas e as derivações da linha germinativa V e J estão indicadas.

A Figura 5 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesadas de 3G8 (SEQ ID NO: 1) e 3G8a (SEQ ID NO: 1) com a sequência de aminoácidos de V_H 3-30.3 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 51) (linha germinativa JH4b divulgada como SEQ ID NO: 59).

A Figura 6 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 4D5 (SEQ ID NO: 2) com a sequência de aminoácidos de V_H 3-30.3 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 51) (linha germinativa JH4b divulgada como SEQ ID NO: 60).

A Figura 7 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesadas de 12C6 (SEQ ID NO: 3) e 12C6a (SEQ ID NO: 2) com a sequência de aminoácidos de V_H DP44 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 52) (linhas germinativas 3-7, 3-23, e JH4b divulgadas como SEQ ID NOS 61-63, respectivamente).

A Figura 8 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 7C8 (SEQ ID NO: 4) com a sequência de aminoácidos de V_H 3-33 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 53) (linha germinativa 3H6b divulgada como SEQ ID NO: 64).

A Figura 9 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeias leves de 3G8 (SEQ ID NO: 5) e 3G8a (SEQ ID NO: 6) com a sequência de aminoácidos de V_k L15 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 54) (linha germinativa JK1 divulgada como SEQ ID NO: 65).

A Figura 10 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 4D5 (SEQ ID NO: 7) com a sequência de aminoácidos de V_k A10 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 55) (linha germinativa JK5 divulgada como SEQ ID NO: 66).

A Figura 11 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12C6 (SEQ ID NO: 8) com a sequência de aminoácidos de V_k A27 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 56) (linha germinativa JK2 divulgada como SEQ ID NO: 67).

A Figura 12 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12C6a (SEQ ID NO: 9) com a sequência de aminoácidos de V_k L15 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 54) (linha germinativa JK2 divulgada como SEQ ID NO: 68).

A Figura 13 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7C8 (SEQ ID NO: 10) com a sequência de aminoácidos de V_k L6 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 57) (linha germinativa JK3 divulgada como SEQ ID NO: 69).

A Figura 14 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que o anticorpo monoclonal humano 7C8, dirigido contra a PTK7 humana, se liga à superfície celular de células HEK3 transfectadas com PTK7 humana inteira.

A Figura 15 mostra os resultados de experiências de ELISA demonstrando que anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra a PTK7 humana se ligam especificamente a PTK7.

A Figura 16 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos dirigidos contra a PTK7 humana se ligam à superfície celular de células de tumor de Wilms.

A Figura 17 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos dirigidos contra a PTK7 humana se ligam à superfície celular de uma variedade de linhas celulares de cancro.

A Figura 18 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos dirigidos contra a PTK7 humana se ligam à superfície celular de células dendríticas.

A Figura 19 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos dirigidos contra a PTK7 humana se ligam a linfócitos T CD4+ e CD8+, mas não a linfócitos B.

A Figura 20 mostra os resultados de experiências de internalização de Hum-Zap demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra a PTK7 humana se podem internalizar em células PTK7+. (A) Internalização dos anticorpos humanos 3G8, 4D5 e 7C8 em células de tumor de Wilms. (B) Internalização do anticorpo humano 12C6 em células de tumor de Wilms. (C) Internalização dos anticorpos humanos 7C8 e 12C6 em células tumorais A-431. (D) Internalização dos anticorpos humanos 7C8 e 12C6 em células tumorais PC3.

A Figura 21 mostra os resultados de um ensaio de proliferação celular demonstrando que anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 conjugados com toxina matam linhas celulares de cancro renal humano.

A Figura 22 mostra os resultados de um ensaio de proliferação celular demonstrando que anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 conjugados com toxina matam linhas celulares expressando níveis baixos a elevados de expressão de PTK7.

A Figura 23 mostra os resultados de um ensaio de invasão demonstrando que anticorpos anti-PTK7 inibem a mobilidade da invasão das células expressando PTK7 na superfície celular.

A Figura 24 mostra os resultados de um estudo de xenoenxerto de tumor *in vivo* demonstrando que anticorpos anti-PTK7 conjugados com uma toxina atrasaram a progressão do crescimento tumoral em cancro do pâncreas.

A Figura 25 mostra os resultados de um estudo de xenoenxerto de tumor *in vivo* demonstrando que anticorpos anti-PTK7 conjugados com uma toxina atrasaram a progressão do crescimento tumoral em cancro da mama.

Descrição Detalhada do Invento

Num aspecto, o presente invento refere-se a anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos, que se ligam especificamente a PTK7. Em certas concretizações, os anticorpos do invento exibem uma ou mais propriedades funcionais desejadas, tais como ligação de elevada afinidade a PTK7 e/ou a capacidade para inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* ou *in vivo*. Em certas concretizações, os anticorpos do invento são derivados de sequências de determinadas cadeias pesadas e leves da linha germinativa e/ou compreendem determinadas características estruturais tais como regiões CDR compreendendo determinadas sequências de aminoácidos. O invento proporciona anticorpos isolados, métodos de produção de tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas compreendendo tais anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, os imunoconjugados ou as moléculas biespecíficas do invento. O invento refere-se também a métodos de utilização dos anticorpos, tais como para tratar doenças tais como cancro.

Para que o presente invento possa ser mais facilmente compreendido, são primeiro definidos certos termos. Definições adicionais são estabelecidas ao longo da descrição detalhada.

Os termos "PTK7" e "CCK4" são utilizados indiferentemente e incluem variantes, isoformas e homólogos de espécie da PTK7 humana. Deste modo, os anticorpos humanos do invento podem, em certos casos, reagir de forma cruzada com PTK7 de outras espécies que não a humana. Em certas concretizações, os anticorpos podem ser completamente específicos para uma ou mais PTK7 humanas e podem não exibir reactividade cruzada com outras espécies ou outros tipos não humanos. A sequência de aminoácidos completa de uma PTK7 humana exemplar tem o número de acesso Genbank NM_002821 (SEQ ID NO: 58).

O termo "resposta imunitária" refere-se à acção de, por exemplo, linfócitos, células de apresentação do antigénio, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em danos, destruição ou eliminação selectiva do corpo humano de patogénios invasores, células ou tecidos infectados com patogénios, células cancerosas, ou, nos casos de auto-imunidade e inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal a partir de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. Tal como aqui utilizada, a frase "receptor da superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de tal sinal através da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor da superfície celular" do presente invento é o receptor PTK7.

O termo "anticorpo" tal como aqui referido inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação ao antigénio (i.e., "porção de ligação ao antigénio") ou cadeias simples deste. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas através de ligações dissulfureto, ou uma porção de ligação ao antigénio deste. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável de

cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é constituída por três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é constituída por uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é constituída por um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDR e quatro FR, dispostas do terminal amino para o terminal carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou factores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunitário (p. ex., células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema do complemento clássico.

O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), tal como aqui utilizado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (p. ex., PTK7). Foi mostrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser efectuada através de fragmentos de um anticorpo inteiro. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados através de uma ponte dissulfureto na região charneira; (iii) um fragmento Fab', que é essencialmente um Fab com parte da região charneira (ver, "FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY" (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e C_{H1} ; (v) um fragmento Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo; (vi) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste num domínio V_H ; (vii) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada; e (viii) a nanocorpo, uma região variável de cadeia pesada contendo um domínio variável simples e dois domínios

constantes. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H, são codificados por genes separados, podem ser ligados, utilizando métodos recombinantes, através de um ligador sintético que lhes permite que sejam produzidos como uma única cadeia proteica em que as regiões V_L e V_H emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); ver, por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85: 5879-5883). Pretende-se que tais anticorpos de cadeia simples estejam também englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas dos peritos na técnica, e os fragmentos são pesquisados quanto à utilidade da mesma maneira que o são os anticorpos intactos.

Um "anticorpo isolado", tal como aqui se utiliza, pretende referir-se a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos possuindo diferentes especificidades antigénicas (p. ex., um anticorpo isolado que se liga especificamente a PTK7 é substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos que não PTK7). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a PTK7 pode, no entanto, ter reactividade cruzada com outros antígenos, tais como moléculas de PTK7 de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou de químicos.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" tal como aqui se utiliza refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal apresenta uma única especificidade de ligação e afinidade para um determinado epitopo.

O termo "anticorpo humano", tal como aqui se utiliza, pretende incluir anticorpos possuindo regiões variáveis em que tanto as regiões estruturais como as CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Além disso, se o anticorpo compreender uma região constante, a região constante é também derivada de sequências de

imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos do invento podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (p. ex. mutações introduzidas através de mutagénese aleatória ou específica do local *in vitro* ou através de mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo "anticorpo humano", tal como aqui se utiliza, não pretende incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, tal como um ratinho, foram enxertadas em sequências estruturais humanas.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos apresentando uma única especificidade de ligação que possuem regiões variáveis em que tanto as regiões estruturais como as CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Numa concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal transgénico não humano, p. ex., um ratinho transgénico, possuindo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", tal como aqui se utiliza, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados através de meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados a partir de um animal (p. ex., um ratinho) que seja transgénico ou transcrômossómico para genes de imunoglobulinas humanas ou um hibridoma preparado a partir deste (descrito mais abaixo), (b) anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, p. ex., a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca combinatória de anticorpos humanos recombinantes, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados através de quaisquer outros meios que envolvam o processamento alternativo de sequências de genes de imunoglobulina humanas com outras sequências de ADN. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis nas quais as regiões estruturais e as CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas concretizações, no entanto, tais anticorpos humanos

recombinantes podem ser submetidos a mutagénese *in vitro* (ou, quando é utilizado um animal transgénico para sequências de Ig humanas, mutagénese somática *in vivo*) e assim as sequências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de, e relacionadas com, sequências de V_H e V_L da linha germinativa humana, podem não existir naturalmente no repertório de anticorpos da linha germinativa humana *in vivo*.

Tal como aqui se utiliza, "isotipo" refere-se à classe de anticorpos (p. ex., IgM ou IgG1) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo que reconhece um antigénio" e "um anticorpo específico para um antigénio" são aqui utilizadas indiferentemente com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antigénio".

O termo "derivados de anticorpos humanos" refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo humano, p. ex., um conjugado de anticorpo e outro agente ou anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" pretende referir-se a anticorpos em que sequências das CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, tal como um ratinho, foram enxertadas em sequências estruturais humanas. Modificações adicionais da região estrutural podem ser feitas dentro das sequências estruturais humanas.

O termo "anticorpo quimérico" pretende referir-se a anticorpos em que as sequências das regiões variáveis são derivadas de uma espécie e as sequências das regiões constantes são derivadas de outra espécie, tal como um anticorpo em que as sequências das regiões variáveis são derivadas de um anticorpo de ratinho e as sequências das regiões constantes são derivadas de um anticorpo humano.

Tal como aqui se utiliza, um anticorpo que "se liga especificamente a PTK7 humana" pretende referir-se a um anticorpo que se liga a PTK7 humana com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos, de preferência 5×10^{-8} M ou menos, de maior preferência 1×10^{-8} M ou menos, ainda de preferência 5×10^{-9} M ou menos.

O termo "não se liga substancialmente" a uma proteína ou células, tal como aqui se utiliza, significa que não se liga ou não se liga com uma afinidade elevada à proteína ou às células, i.e. liga-se à proteína ou às células com uma K_D de 1×10^{-6} M ou mais, de preferência 1×10^{-5} M ou mais, de maior preferência 1×10^{-4} M ou mais, ainda de preferência 1×10^{-3} M ou mais, ainda de maior preferência 1×10^{-2} M ou mais.

O termo " K_{assoc} " ou " K_a ", tal como aqui se utiliza, pretende referir-se à velocidade de associação de uma determinada interacção anticorpo-antigénio, enquanto o termo " K_{dis} " ou " K_d ", tal como aqui se utiliza, pretende referir-se à velocidade de dissociação de uma determinada interacção anticorpo-antigénio. O termo " K_D ", tal como aqui se utiliza, pretende referir-se à constante de dissociação, que é obtida a partir da razão de K_d para K_a (i.e., K_d/K_a) e é expresso como concentração molar (M). Os valores de K_D para anticorpos podem ser determinados utilizando métodos bem estabelecidos na técnica. Um método preferido para a determinação da K_D de um anticorpo é através da utilização de ressonância de plasmão de superfície, de preferência utilizando um sistema biossensor tal como um sistema Biacore®.

Tal como aqui se utiliza, o termo "elevada afinidade" para um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo possuindo uma K_D de 10^{-8} M ou menos, de preferência 10^{-9} M ou menos e de maior preferência 10^{-10} M ou menos para um antigénio alvo. No entanto, a ligação de "elevada afinidade" pode variar para outros isotipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "elevada afinidade" para um isotipo IgM refere-se a um anticorpo possuindo uma K_D de 10^{-7} M ou menos, de preferência 10^{-8} M ou menos, de maior preferência 10^{-9} M ou menos.

Tal como aqui se utiliza, o termo "sujeito" inclui qualquer animal humano ou não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, p. ex., mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

Vários aspectos do invento são descritos em mais detalhe nas seguintes subsecções.

Anticorpos Anti-PTK7

Os anticorpos do invento são caracterizados por determinadas características ou propriedades funcionais dos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos ligam-se especificamente a PTK7. De preferência, um anticorpo do invento liga-se a PTK7 com elevada afinidade, por exemplo com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos. De preferência, o anticorpo liga-se a PTK7 humana com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, liga-se a PTK7 humana com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menos, liga-se a PTK7 humana com uma K_D de 5×10^{-9} M ou menos, ou liga-se a PTK7 humana com uma K_D de entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M ou menos. O anticorpo liga-se a células de tumor de Wilms com uma CE_{50} de 4,0 nM ou menos, ou liga-se a células de tumor de Wilms com uma CE_{50} de 3,5 nM ou menos. Os ensaios padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos a PTK7 são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISA, *Western blots* e RIA. A cinética de ligação (p. ex., afinidade de ligação) dos anticorpos pode também ser avaliada através de ensaios padrão conhecidos na técnica, tal como através de ELISA, análise de Scatchard e Biacore. Como outro exemplo, os anticorpos do presente invento podem ligar-se a uma linha de células tumorais de carcinoma do rim, por exemplo, uma linha celular de tumor de Wilms. Ensaios adequados para avaliação de qualquer uma das características acima descritas são descritos em detalhe nos Exemplos.

Anticorpos Monoclonais 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8

Os anticorpos do invento incluem os anticorpos monoclonais humanos 4D5, 12C6 e 7C8. Outros anticorpos aqui divulgados incluem 3G8, 3G8a e 12C6. Todos os anticorpos foram isolados e estruturalmente caracterizados tal como descrito nos Exemplos 1 e 2. Os vulgares peritos na técnica devem apreciar que os anticorpos 3G8 e 3G8a, bem como os anticorpos 12C6 e 12C6a possuem a mesma sequência de cadeia pesada, embora difiram nas suas sequências de cadeia leve. As sequências de aminoácidos de V_H de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 1 (3G8 e 3G8a), 2 (4D5), 3 (12C6 e 12C6a) e 4 (7C8). As sequências de

aminoácidos de V_L de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

Dado que cada um destes anticorpos se pode ligar a PTK7, as sequências de V_H e V_L podem ser "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-PTK7. A ligação a PTK7 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (p. ex., ELISA). De preferência, quando as cadeias de V_H e V_L são misturadas e combinadas, a sequência de V_H de um determinado emparelhamento V_H/V_L é substituída por uma sequência de V_H estruturalmente semelhante. Da mesma forma, de preferência uma sequência de V_L de um determinado emparelhamento V_H/V_L é substituída por uma sequência V_L estruturalmente semelhante.

Concordantemente, num aspecto, é aqui descrito um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e 4; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9 e 10;

em que o anticorpo se liga especificamente a PTK7, de preferência PTK7 humana.

O anticorpo, ou porção de ligação ao anticorpo deste, do invento pode compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Outras combinações divulgadas de cadeias pesadas e leves incluem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

Noutro aspecto, são aqui divulgados anticorpos que compreendem as CDR1, CDR2 e CDR3 das cadeias pesadas e cadeias leves de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8, ou combinações destas. As sequências de aminoácidos das CDR1 de V_H de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 11 (3G8 e 3G8a), 12 (4D5), 13 (12C6 e 12C6a) e 14 (7C8). As sequências de aminoácidos das CDR2 de V_H de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 15 (3G8 e 3G8a), 16 (4D5), 17 (12C6 e 12C6a) e 18 (7C8). As sequências de aminoácidos das CDR3 de V_H de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 19 (3G8 e 3G8a), 20 (4D5), 21 (12C6 e 12C6a) e 22 (7C8). As sequências de aminoácidos das CDR1 de V_k de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 e 28, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR2 de V_k de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33 e 34, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR3 de V_k de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39 e 40, respectivamente. As regiões CDR são delineadas utilizando o sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242).

Dado que cada um destes anticorpos se pode ligar a PTK7 e que a especificidade de ligação ao antigénio é proporcionada principalmente pelas regiões CDR1, CDR2, e CDR3, as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 de V_H e as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 de V_k podem ser "misturadas e combinadas" (i.e., CDR de diferentes anticorpos podem ser misturadas e combinadas, embora cada anticorpo deva conter uma CDR1, CDR2, e CDR3 de V_H e uma CDR1, CDR2, e CDR3 de V_k) para criar outras moléculas de ligação anti-PTK7 do invento. A ligação a PTK7 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (p. ex., ELISA, análise Biacore). De preferência, quando as sequências das CDR de V_H são misturadas e combinadas, a sequência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma determinada sequência de V_H é substituída por uma ou mais sequências CDR estruturalmente semelhantes. De igual modo, quando as sequências de CDR de V_k são misturadas e combinadas, a sequência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma determinada sequência de V_k é, de preferência, substituída por uma ou mais sequências de CDR estruturalmente semelhantes. Será facilmente aparente para o vulgar perito na técnica que novas sequências de V_H e V_L podem ser criadas através da substituição de uma ou mais sequências das regiões CDR de V_H e/ou V_L por sequências estruturalmente semelhantes das sequências de CDR aqui divulgadas para os anticorpos monoclonais 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8.

Concordantemente, noutro aspecto, é aqui divulgado um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antigénio deste compreendendo:

- (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 11, 12, 13 e 14;
- (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15, 16, 17 e 18;
- (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19, 20, 21 e 22;
- (d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a

partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 e 28;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33 e 34; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39 e 40;

em que o anticorpo se liga especificamente a PTK7, de preferência PTK7 humana.

O anticorpo, ou porção de ligação ao antigénio deste, do invento pode compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 12;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 16;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 20;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 25;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 31; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 37;

ou

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 14;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 18;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 22;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 28;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 34; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 40;

ou

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 13;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 17;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 21;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 26;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 32; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 38.

São também aqui divulgados anticorpos compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 11;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 15;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 19;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 23;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 29; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 35;

ou

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 11;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 15;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 19;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 24;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 30; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 36;

ou

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 13;

- (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 17;
- (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 21;
- (d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 27;
- (e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 33; e
- (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 39;

É bem conhecido na técnica que o domínio CDR3, independentemente do domínio CDR1 e/ou CDR2, pode determinar sozinho a especificidade de ligação de um anticorpo para um antígeno cognato e que podem ser previsivelmente gerados múltiplos anticorpos possuindo a mesma especificidade de ligação com base numa sequência CDR3 comum. Ver, por exemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2): 252-260 (2000) (descrevendo a produção de um anticorpo anti-CD30 humanizado utilizando apenas o domínio variável de cadeia pesada CDR3 do anticorpo anti-CD30 de murídeo Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296: 833-849 (2000) (descrevendo anticorpos da glicoproteína-2 epitelial (EGP-2) recombinantes utilizando apenas a sequência da CDR3 de cadeia pesada do anticorpo parental de murídeo anti-EGP-2 MOC-31); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8910-8915 (1998) (descrevendo um painel de anticorpos anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ humanizados utilizando um domínio variável CDR3 de cadeia pesada e leve de um anticorpo anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ de murídeo LM609 em que cada anticorpo membro compreende uma sequência distinta fora do domínio CDR3 e é capaz de se ligar ao mesmo epitopo que o anticorpo de murídeo parental com afinidades tão elevadas ou mais que o anticorpo de murídeo parental); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116: 2161-2162 (1994) (divulgando que o domínio CDR3 proporciona a contribuição mais significativa para a ligação ao antígeno); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2529-2533 (1995) (descrevendo o enxerto de sequências de CDR3 de cadeia pesada de três Fabs (SI-1, SI-40, e SI-32) contra ADN placentário humano na cadeia pesada de um Fab anti-toxóide do tétano substituindo deste modo a CDR3 da cadeia pesada existente e demonstrando que o domínio CDR3 sozinho conferiu especificidade de ligação); e Ditzel *et*

al., J. Immunol. 157: 739-749 (1996) (descrevendo estudos de enxertos em que a transferência de apenas a CDR3 da cadeia pesada de um Fab poli-específico parental LNA3 numa cadeia pesada de um anticorpo Fab IgG monoespecífico de ligação ao toxóide do tétano p313 foi suficiente para manter a especificidade de ligação do Fab parental).

Consequentemente, são aqui divulgados anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia leve e/ou pesada a partir de um anticorpo derivado de um animal humano ou não humano, em que o anticorpo monoclonal é capaz de se ligar especificamente a PTK7. São também aqui divulgados anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não humano, tal como um anticorpo de ratinho ou rato, em que o anticorpo monoclonal é capaz de se ligar especificamente a PTK7. Tais anticorpos compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não humano (a) são capazes de competir pela ligação com; (b) mantêm as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epitopo; e/ou (d) têm uma afinidade de ligação semelhante à do anticorpo não humano parental correspondente.

São também aqui divulgados anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido a partir de um animal não humano, em que o anticorpo humano é capaz de se ligar especificamente a PTK7. Também são aqui divulgados anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um primeiro anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido a partir de um animal não humano, em que o primeiro anticorpo humano é capaz de se ligar especificamente a PTK7 e em que um domínio CDR3 de um primeiro anticorpo humano substitui um domínio CDR3 num anticorpo humano sem especificidade de ligação para PTK7 para gerar um segundo anticorpo humano que seja capaz de se ligar especificamente a PTK7. Tais anticorpos compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve do primeiro anticorpo humano (a) são capazes de competir pela ligação com; (b) mantêm as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epitopo; e/ou (d) têm uma afinidade de ligação

semelhante à do primeiro anticorpo humano parental correspondente. O primeiro anticorpo humano pode ser 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a ou 7C8.

Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epitopo que os Anticorpos Anti-PTK7 do Invento

O invento proporciona anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo na PTK7 humana que qualquer um dos anticorpos monoclonais de PTK7 do invento (isto é, anticorpos que têm a capacidade de competir de forma cruzada pela ligação a PTK7 com qualquer um dos anticorpos monoclonais do invento). O anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser o anticorpo monoclonal 4D5 (possuindo as sequências de V_H e V_L tal como mostradas em SEQ ID NOs: 2 e 7, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 12C6 (possuindo as sequências de V_H e V_L tal como mostradas em SEQ ID NOs: 3 e 8, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 7C8 (possuindo as sequências de V_H e V_L tal como mostradas em SEQ ID NOs: 4 e 10, respectivamente). Tais anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base na sua capacidade para reagir de forma cruzada com 4D5, 12C6 ou 7C8 em ensaios padrão de ligação a PTK7. Por exemplo, análise BIAcore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo podem ser utilizados para demonstrar competição cruzada com os anticorpos do presente invento. A capacidade de um anticorpo de teste para inibir a ligação de, por exemplo, 4D5, 12C6 ou 7C8, a PTK7 humana demonstra que o anticorpo de teste pode competir com 4D5, 12C6 ou 7C8 pela ligação a PTK7 humana e liga-se assim ao mesmo epitopo na PTK7 humana que 4D5, 12C6 ou 7C8. O anticorpo que se liga ao mesmo epitopo na PTK7 humana que 4D5, 12C6 ou 7C8 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados tal como descrito nos Exemplos.

Moléculas de Ácido Nucleico Codificando os Anticorpos do Invento

Outro aspecto do invento refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos do invento. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, num lisado celular, ou numa forma parcialmente purificada ou

substancialmente pura. Um ácido nucleico está "isolado" ou "é tornado substancialmente puro" quando é purificado de outros componentes celulares ou outros contaminantes, p. ex., outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, através de técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, ligação a CsCl, cromatografia de coluna, electroforese em gel de agarose e outras bem conhecidas na técnica. Ver, F. Ausubel, et al., ed. (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Um ácido nucleico do invento pode ser, por exemplo, ADN ou ARN e pode conter ou não sequências intrónicas. Numa concretização preferida, o ácido nucleico é uma molécula de ADNc.

Os ácidos nucleicos podem ser obtidos utilizando técnicas de biologia molecular padrão. Para anticorpos expressos por hibridomas (p. ex., hibridomas preparados a partir de ratinhos transgénicos portadores de genes de imunoglobulinas humanas tal como descrito mais abaixo), os ADNc codificando as cadeias leves e pesadas do anticorpo produzido pelo hibridoma podem ser obtidos através de amplificação padrão por PCR ou técnicas de clonagem de ADNc. Para os anticorpos obtidos a partir de uma biblioteca de genes de imunoglobulina (p. ex., utilizando técnicas de apresentação fágica), o ácido nucleico codificando o anticorpo pode ser recuperado a partir da biblioteca.

As moléculas de ácidos nucleicos preferidas são as que codificam as sequências de V_H e V_L dos anticorpos monoclonais 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a ou 7C8. As sequências de ADN codificando as sequências de V_H de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 41 (3G8 e 3G8a), 42 (4D5), 43 (12C6 e 12C6a) e 44 (7C8). As sequências de ADN codificando as sequências de V_L de 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 são mostradas em SEQ ID NOs: 45, 46, 47, 48, 49 e 50, respectivamente.

Uma vez obtidos os fragmentos de ADN codificando os segmentos de V_H e V_L , estes fragmentos de ADN podem ainda ser manipulados através de técnicas padrão de ADN recombinante, por exemplo para converter os genes da região variável em genes de cadeias de anticorpos inteiros, em genes de fragmentos Fab, ou num gene de scFv. Nestas manipulações, um

fragmento de ADN codificando V_L ou V_H é operativamente ligado a outro fragmento de ADN codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente ligado", tal como utilizado neste contexto, pretende significar que os dois fragmentos de ADN são ligados de modo a que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de ADN permanecem enquadradas.

O ADN isolado codificando a região V_H pode ser convertido num gene de cadeia pesada inteiro através da ligação de forma operativa do ADN codificando V_H a outra molécula de ADN codificando regiões constantes de cadeias pesadas (CH1, CH2 e CH3). As sequências dos genes das regiões constantes das cadeias pesadas humanas são conhecidas na técnica (ver, p. ex., Kabat, E.A., et al., (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242) e os fragmentos de ADN englobando estas regiões podem ser obtidos através de amplificação padrão por PCR. A região constante da cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, mas é de preferência uma região constante de IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o ADN codificando V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de ADN codificando apenas a região constante da cadeia pesada CH1.

O ADN isolado codificando a região V_L pode ser convertido num gene de cadeia leve inteiro (bem como um gene de cadeia leve Fab) através da ligação de forma operativa do ADN codificando V_L a outra molécula de ADN codificando a região constante de cadeia leve, CL. As sequências dos genes das regiões constantes das cadeias leves humanas são conhecidas na técnica (ver p. ex., Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242) e os fragmentos de ADN englobando estas regiões podem ser obtidos através de amplificação padrão por PCR. A região constante da cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda, mas é de preferência uma região constante capa.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de ADN codificando V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligador flexível, p. ex., codificando a sequência de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de modo a que as sequências de V_H e V_L possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões V_L e V_H unidas através do ligador flexível (ver p. ex., Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348: 552-554).

Produção dos Anticorpos Monoclonais do Invento

Os anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, incluindo metodologia convencional de anticorpos monoclonais, p. ex. a técnica de hibridação de células somáticas padrão de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Embora sejam preferidos os procedimentos de hibridação de células somáticas, em princípio, outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais podem ser empregues, p. ex. transformação viral ou oncogénica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para a preparação de hibridomas é o sistema de murídeo. A produção de hibridomas no ratinho é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos de imunização e as técnicas para o isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Os parceiros de fusão (p. ex., células de mieloma de murídeo) e os procedimentos de fusão são também conhecidos.

Os anticorpos quiméricos ou humanizados podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de murídeo preparado tal como descrito acima. O ADN codificando as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma de murídeo de interesse e modificado para conter sequências de imunoglobulina sem serem de murídeo (p. ex., humanas) utilizando técnicas padrão de biologia molecular. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murídeo podem ser ligadas a regiões constantes humanas utilizando métodos conhecidos na

técnica (ver, p. ex., Patente U.S. No. 4816567 para Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR de murídeo podem ser inseridas numa estrutura humana utilizando métodos conhecidos na técnica (ver, p. ex., Patente U.S. No. 5225539 para Winter, e Patentes U.S. Nos. 5530101, 5585089, 5693762, e 6180370 para Queen et al.).

Os anticorpos do invento são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra PTK7 podem ser gerados utilizando ratinhos transgênicos ou transcromossômicos possuindo partes do sistema imunitário humano em vez do sistema de ratinho. Estes ratinhos transgênicos e transcromossômicos incluem ratinhos aqui referidos como ratinhos HuMAb e ratinhos KM[™], respectivamente, e são colectivamente aqui referidos como "ratinhos de Ig humana".

O ratinho HuMAb[®] (Medarex, Inc.) contém *miniloci* de genes de imunoglobulina humana que codificam sequências de imunoglobulina de cadeias pesadas (μ e γ) e leves κ humanas não rearranjadas, juntamente com mutações direccionadas que inactivam os *loci* das cadeias μ e κ endógenas (ver, p. ex., Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Concordantemente, os ratinhos exibem reduzida expressão de IgM ou κ de ratinho, e em resposta a imunização, os transgenes das cadeias pesadas e leves humanas introduzidos sofrem troca de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG κ humanos de elevada afinidade (Lonberg, N. et al. (1994), "Handbook of Experimental Pharmacology" 113: 49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). A preparação e utilização de ratinhos HuMAb, e as modificações genómicas transportadas por tais ratinhos, são ainda descritas em Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; e Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Ver ainda, Patentes

U.S. Nos. 5545806; 5569825; 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 e 5770429 todas para Lonberg e Kay; Patente U.S. No. 5545807 para Surani *et al.*; Publicação PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas para Lonberg e Kay; e Publicação PCT No. WO 01/14424 para Korman *et al.*

Noutra concretização, os anticorpos humanos do invento podem ser criados utilizando um ratinho que possua sequências de imunoglobulina humanas em transgenes e transcromossomas, tal como um ratinho que possua um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana. Tais ratinhos, aqui referidos como "ratinhos KM[™]", são descritos em detalhe na Publicação PCT WO 02/43478 para Ishida *et al.*

Ainda, sistemas de animais transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulinas humanas estão disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir os anticorpos anti-PTK7 do invento. Por exemplo, pode ser utilizado um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse (Abgenix, Inc.); tais ratinhos são descritos em, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5939598, 6075181, 6114598, 6150584 e 6162963 para Kucherlapati *et al.*

Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos que expressam genes de imunoglobulinas humanas estão disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir os anticorpos anti-PTK7 do invento. Por exemplo, podem ser utilizados ratinhos que possuam tanto um transcromossoma de cadeia pesada humana como um transcromossoma de cadeia leve humana, referidos como "ratinhos TC"; tais ratinhos estão descritos em Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Além disso, vacas possuindo transcromossomas de cadeias pesadas e leves humanas têm sido descritas na técnica (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894) e podem ser utilizadas para criar os anticorpos anti-PTK7 do invento.

Os anticorpos monoclonais humanos do invento podem também ser preparados utilizando métodos de apresentação fágica para pesquisa de bibliotecas de genes de imunoglobulinas humanas. Tais métodos de apresentação fágica

para isolamento de anticorpos humanos estão estabelecidos na técnica. Ver por exemplo: Patentes U.S. Nos. 5223409, 5403484, e 5571698 para Ladner *et al.*, Patentes EUA Nos. 5427908 e 5580717 para Dower *et al.*, Patentes EUA Nos. 5969108 e 6172197 para McCafferty *et al.*, e Patentes EUA Nos. 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 e 6593081 para Griffiths *et al.*

Os anticorpos monoclonais humanos do invento podem também ser preparados utilizando ratinhos SCID nos quais células imunitárias humanas foram reconstituídas de modo a que possa ser gerada uma resposta de anticorpos humanos após imunização. Tais ratinhos estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5476996 e 5698767 para Wilson *et al.*

Imunização de Ratinhos de Ig Humanas

Quando são utilizados ratinhos de Ig humanas para produzir os anticorpos humanos do invento, tais ratinhos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno PTK7 e/ou PTK7 recombinante, ou uma proteína de fusão de PTK7, tal como descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; e Publicação PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. De preferência, os ratinhos terão 6-16 semanas de idade após a primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 µg) de antígeno PTK7 pode ser utilizada para imunizar os ratinhos de Ig humana intraperitonealmente.

Os procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para PTK7 estão descritos no Exemplo 1 abaixo. A experiência acumulada com vários antígenos mostrou que os ratinhos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante completo de Freund, seguido por imunizações IP semana sim semana não (até um total de 6) com o antígeno em adjuvante incompleto de Freund. No entanto, verifica-se que outros adjuvantes além de Freund são também eficazes. Além disso, verifica-se que as células intactas na ausência de adjuvante são altamente imunogênicas. A resposta imunitária pode ser monitorizada ao longo do curso do

protocolo de imunização sendo as amostras de plasma obtidas através de sangrias retro-orbitais. O plasma pode ser pesquisado através de ELISA (tal como descrito abaixo), e os ratinhos com títulos suficientes de imunoglobulina anti-PTK7 humana podem ser utilizados para fusões. Os ratinhos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e da remoção do baço. Espera-se que possa ser necessário realizar 2-3 fusões para cada imunização. Entre 6 e 24 ratinhos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Habitualmente, são utilizadas ambas as estirpes HCo7 e HCo12. Além disso, ambos os transgenes HCo7 e HCo12 podem ser criados juntamente num único ratinho possuindo dois transgenes de cadeia pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativamente ou adicionalmente, pode ser utilizada a estirpe de ratinhos KM[™], tal como descrito no Exemplo 1.

Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos do Invento

Para gerar hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais humanos do invento, esplenócitos e/ou células de nódulos linfáticos de ratinhos imunizados podem ser isolados e fundidos com uma linha celular imortalizada apropriada, tal como uma linha celular de mieloma de ratinho. Os hibridomas resultantes podem ser pesquisados quanto à produção de anticorpos específicos para o antígeno. Por exemplo, suspensões de células individuais de linfócitos do baço de ratinhos imunizados podem ser fundidas com um sexto do número de células de mieloma de ratinho não secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG a 50%. As células são plaqueadas a aproximadamente 2×10^5 numa placa de microtitulação de fundo plano, seguido de uma incubação de duas semanas em meio selectivo contendo Soro de Clone fetal a 20%, meio condicionado "653" a 18%, Origen a 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sódio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e HAT $1 \times$ (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas num meio em que o HAT é substituído por HT. Os poços individuais podem então ser pesquisados através de ELISA quanto a anticorpos monoclonais humanos IgM e IgG. Uma vez ocorrido crescimento

extensivo do hibridoma, o meio pode ser observado habitualmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos podem ser replaqueados, novamente pesquisados e se ainda forem positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitante. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

Para purificar anticorpos monoclonais humanos, os hibridomas seleccionados podem ser cultivados em frascos rotativos de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). O IgG eluído pode ser verificado através de electroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar a pureza. A solução tampão pode ser mudada para PBS, e a concentração pode ser determinada através de DO_{280} utilizando o coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C .

Geração de Transfectomas Produtores de Anticorpos Monoclonais do Invento

Os anticorpos do invento podem também ser produzidos num transfectoma de células hospedeiras utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de ADN recombinante e métodos de transfecção de genes, tal como é bem conhecido na técnica (p. ex., Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo destes, ADN codificando cadeias leves e pesadas parciais ou inteiras, podem ser obtidos através de técnicas padrão de biologia molecular (p. ex., amplificação por PCR ou clonagem de ADNc utilizando um hibridoma que expresse o anticorpo de interesse) e os ADN podem ser inseridos em vectores de expressão de modo a que os genes fiquem operativamente ligados a sequências de controlo da transcrição e tradução. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" pretende significar que um gene de anticorpo está ligado num vector de tal modo que as

sequências de controlo da transcrição e da tradução dentro do vector desempenhem a sua função pretendida de regulação da transcrição e tradução do gene do anticorpo. As sequências do vector de expressão e de controlo da expressão são escolhidas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vectores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vector de expressão através de métodos padrão (p. ex., ligação de locais de restrição complementares no fragmento do gene de anticorpo e no vector, ou ligação de extremidades cegas se não estiverem presentes locais de restrição). As regiões variáveis de cadeia leve e pesadas dos anticorpos aqui descritos podem ser utilizadas para criar genes de anticorpos inteiros de qualquer isotipo de anticorpo através da sua inserção em vectores de expressão codificando já as regiões constante da cadeia pesada e constante da cadeia leve do isotipo desejado de modo a que o segmento V_H esteja operativamente ligado ao segmento ou aos segmentos C_H no vector e o segmento V_K esteja operativamente ligado ao segmento C_L no vector. Adicionalmente ou alternativamente, o vector de expressão recombinante pode codificar um péptido sinal que facilite a secreção da cadeia do anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vector de modo a que o péptido sinal esteja ligado enquadrado com o terminal amino do gene da cadeia de anticorpo. O péptido sinal pode ser um péptido sinal de imunoglobulina ou um péptido sinal heterólogo (i.e., um péptido sinal de uma proteína sem ser imunoglobulina).

Além dos genes das cadeias de anticorpo, os vectores de expressão recombinante do invento possuem sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes das cadeias de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" pretende incluir promotores, estimuladores e outros elementos de controlo da expressão (p. ex., sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou tradução dos genes das cadeias de anticorpo. Tais sequências reguladoras estão descritas, por exemplo, em Goeddel ("*Gene Expression Technology*". *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado pelos peritos na técnica

que o desenho do vector de expressão, incluindo a selecção de sequências reguladoras, pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a transformar, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Sequências reguladoras preferidas para expressão em células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que dirigem níveis elevados de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e/ou estimuladores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus (p. ex., o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e políoma. Alternativamente, podem ser utilizadas sequências de regulação não virais, tais como o promotor de ubiquitina ou o promotor de β -globina. Ainda, outros elementos de regulação compostos por sequências de diferentes fontes, tais como o sistema promotor SR α , que contém sequências do promotor inicial de SV40 e a repetição terminal longa do vírus de leucemia de células T humanas de tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

Para além dos genes de cadeias de anticorpo e das sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinante do invento podem possuir sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (p. ex., origens de replicação) e genes de marcadores seleccionáveis. O gene do marcador seleccionável facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido (ver, p. ex., Pat. U.S. 4399216, 4634665 e 5179017, todas por Axel et al.). Por exemplo, tipicamente o gene do marcador seleccionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes de marcadores seleccionáveis preferidos incluem o gene da di-hidrofolato-redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras dhfr- com selecção/amplificação com metotrexato) e o gene neo (para selecção com G418).

Para expressão das cadeias leves e pesadas, o ou os vectores de expressão codificando as cadeias leves e pesadas são transfectados numa célula hospedeira através de técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" destinam-se a englobar uma ampla variedade de técnicas vulgarmente utilizadas para a introdução de ADN exógeno numa célula

hospedeira procariótica ou eucariótica, p. ex., electroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com DEAE-dextrano e semelhantes. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos do invento em células hospedeiras procariotas ou eucariotas, a expressão de anticorpos em células eucariotas, e de preferência células hospedeiras de mamífero, é a mais preferida, porque tais células eucariotas, e em particular as células de mamífero, são mais propensas do que as células procariotas a montar e segregar um anticorpo corretamente dobrado e imunologicamente activo. A expressão procariótica de genes de anticorpos foi relatada como sendo ineficaz para a produção de elevados rendimentos de anticorpo activo (Boss, M.A. e Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6: 12-13).

Células hospedeiras de mamífero preferidas para expressão dos anticorpos recombinantes do invento incluem células de Ovário de Hamster chinês (células CHO) (incluindo células CHO dhfr-, descritas em Urlaub e Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77: 4216-4220, utilizadas com um marcador seleccionável de DHFR, p. ex., tal como descrito em R.J. Kaufman e P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em particular, para utilização com células de mieloma NSO, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão do gene GS divulgado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338841. Quando vectores de expressão recombinante codificando genes de anticorpos são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos através da cultura das células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, de preferência, a secreção do anticorpo para o meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura utilizando métodos padrão de purificação de proteínas.

Caracterização da Ligação do Anticorpo ao Antígeno

Os anticorpos do invento podem ser testados quanto à ligação a PTK7 através, por exemplo, de ELISA padrão. Resumidamente, placas de microtitulação são revestidas com

PTK7 purificada a 0,25 µg/ml em PBS, e depois bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. Diluições do anticorpo (p. ex., diluições de plasma de ratinhos imunizados com PTK7) são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com reagente secundário (p. ex., para anticorpos humanos, um reagente policlonal de cabra específico de Fc anti-IgG humana) conjugado com fosfatase alcalina, durante 1 hora a 37°C. Após lavagem, as placas foram reveladas com substrato pNPP (1 mg/ml), e analisadas à DO de 405-650. De preferência, os ratinhos que desenvolvem os títulos mais elevados serão utilizados para fusões.

Um ensaio ELISA tal como descrito acima pode também ser utilizado para pesquisa de hibridomas que mostrem reactividade positiva com o imunogénio PTK7. Os hibridomas que se ligam com elevada avidéz a PTK7 são subclonados e melhor caracterizados. Um clone de cada hibridoma que mantenha a reactividade das células parentais (por ELISA), pode ser escolhido para fazer um banco de células de 5-10 frascos armazenados a -140°C, e para a purificação de anticorpos.

Para purificar anticorpos anti-PTK7, os hibridomas seleccionados podem ser cultivados frascos rotativos de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). O IgG eluído pode ser verificado através de electroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar a pureza. A solução tampão pode ser mudada para PBS, e a concentração pode ser determinada através de DO₂₈₀ usando um coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-PTK7 seleccionados se ligam a epitopos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). Estudos de competição, utilizando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados utilizando

placas de ELISA revestidas com PTK7 tal como descrito acima. A ligação do mAb biotinilado pode ser detectada com uma sonda de estrept-avidina-fosfatase alcalina.

Para determinar o isotipo dos anticorpos purificados, podem ser realizados ELISA de isotipo utilizando reagentes específicos para anticorpos de um determinado isotipo. Por exemplo, para determinar o isotipo de um anticorpo monoclonal humano, os poços das placas de microtitulação podem ser revestidos com 1 µg/ml de imunoglobulina anti-humano de um dia para o outro a 4°C. Após bloqueio com BSA a 1%, as placas são feitas reagir com 1 µg/ml ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controlos de isotipo purificados, à temperatura ambiente durante uma a duas horas. Os poços podem então ser feitos reagir com qualquer uma de sondas específicas de IgG1 humana ou IgM humana conjugadas com fosfatase alcalina. As placas são reveladas e analisadas tal como descrito acima.

As IgG anti-PTK7 humanas podem ainda ser testadas quanto à reactividade com o antigénio PTK7 através de *Western blotting*. Resumidamente, PTK7 pode ser preparada e submetida a electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio. Após a electroforese, os antigénios separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro fetal de vitelo a 10%, e sondados com os anticorpos monoclonais a testar. A ligação da IgG humana pode ser detectada utilizando anti-IgG humana-fosfatase alcalina e revelada com comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Imunoconjugados

Noutro aspecto, o presente apresenta um anticorpo anti-PTK7, ou um fragmento deste, conjugado com uma porção terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (p. ex., um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são aqui referidos como "imunoconjugados". Os imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou um agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial para (p. ex., mate) células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina

D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, di-hidroxi-antracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotetosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos destes. Agentes terapêuticos incluem, por exemplo, anti-metabolitos (p. ex., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbazona), agentes alquilantes (p. ex., mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclina (p. ex., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (p. ex., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (p. ex., vincristina e vinblastina).

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas com um anticorpo do invento incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatins, e derivados destes. Um exemplo de um conjugado de anticorpo com caliqueamicina está comercialmente disponível (Mylotarg™, Wyeth-Ayerst). Exemplos de citotoxinas terapêuticas podem ser verificados, por exemplo, nas Pat. U.S. Nos: 6548530 e 6281354 e pedido de Patente U.S. Nos.: US 2003/0064984, US 2003/0073852 e US 2003/0050331.

As citotoxinas podem ser conjugadas com os anticorpos do invento utilizando a tecnologia de ligadores disponível na técnica. Exemplos de tipos de ligadores que tenham sido utilizados para conjugar uma citotoxina com um anticorpo incluem, mas não estão limitados a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfuretos e ligadores contendo péptidos. Pode ser escolhido um ligador que seja, por exemplo, susceptível de clivagem através de pH baixo no interior do compartimento lisossômico ou seja susceptível de clivagem por proteases, tais como proteases de preferência expressas em tecido tumoral, tais como as catepsinas (p. ex., as catepsinas B, C, D).

Para melhor discussão dos tipos de citotoxinas, ligadores e métodos para conjugação de agentes terapêuticos a anticorpos, ver também Saito, G. et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 99-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2: 750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264.

Os anticorpos do presente invento podem também ser conjugados com um isótopo radioactivo para gerar radiofármacos citotóxicos, também referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioactivos que podem ser conjugados com anticorpos para utilização em diagnóstico ou terapia incluem, mas não estão limitados a, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutécio¹⁷⁷. Os métodos para a preparação de radioimunconjugados estão estabelecidos na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados estão comercialmente disponíveis, incluindo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), e métodos semelhantes podem ser utilizados para preparar radioimunoconjugados utilizando os anticorpos do invento.

Os conjugados de anticorpos do invento podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica, e a porção fármaco não deve ser entendida como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção fármaco pode ser uma proteína ou um polipéptido possuindo uma actividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente activa, ou um fragmento activo desta, tais como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina da difteria; uma proteína tal como factor de necrose tumoral ou interferão- γ ; ou, modificadores da resposta biológica, tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor de estimulação de colónias de granulócitos ("G-CSF"), ou outros factores de crescimento.

As técnicas para conjugação de tal porção terapêutica com anticorpos são bem conhecidas, ver, p. ex., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em "Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy", Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em "Controlled Drug Delivery" (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em "Monoclonal Antibodies" 84: *Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em "Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy", Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugados", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Composições Farmacêuticas

Noutro aspecto, o presente invento proporciona uma composição, p. ex., uma composição farmacêutica, contendo um anticorpo ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção ou porções de ligação ao antigénio, do presente invento, formulados juntos com um transportador farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um anticorpo ou uma combinação de anticorpos (p. ex., dois ou mais diferentes) ou imunoconjugados do invento. Por exemplo, uma composição farmacêutica do invento pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados) que se liguem a diferentes epitopos no antigénio alvo ou que tenham actividades complementares.

As composições farmacêuticas do invento podem também ser administradas em terapia de combinação, ou seja, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-PTK7 do presente invento combinado com pelo menos um outro agente anti-inflamatório ou imunossupressor. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser utilizados em terapia de combinação são descritos em maior detalhe abaixo na secção sobre utilizações dos anticorpos do invento.

Tal como aqui se utiliza, "transportador farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e retardadores da absorção, e semelhantes, que sejam fisiologicamente compatíveis. De preferência, o transportador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parentérica, espinal ou epidérmica (p. ex., através de injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto activo, ou seja, o anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser revestido de um material para proteger o composto da acção de ácidos e outras condições naturais que possam inactivar o composto.

Os compostos farmacêuticos do invento podem incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a actividade biológica desejada do composto parental e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (ver p. ex., Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição ácida e sais de adição básica. Sais de adição ácida incluem os derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e semelhantes, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos com fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos e aromáticos e semelhantes. Sais de adição básica incluem os derivados de metais alcalino-terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e semelhantes, bem como a partir de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e semelhantes.

Uma composição farmacêutica do invento pode também incluir um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito

de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbilo, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metais, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

Exemplos de transportadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregues nas composições farmacêuticas do invento incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol, e semelhantes), e misturas adequadas destes, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis, tais como oleato de etilo. A fluidez correcta pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de materiais de revestimento, tais como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso das dispersões, e através da utilização de tensioactivos.

Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada tanto através de procedimentos de esterilização, *supra*, como através da inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, e semelhantes. Pode também ser desejável incluir agentes isotónicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e semelhantes nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injectável pode ser alcançada através da inclusão de agentes que retardem a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Transportadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente activas é conhecida na técnica. Excepto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o composto activo, a sua utilização nas composições farmacêuticas do presente invento está

contemplada. Compostos activos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para uma elevada concentração de fármaco. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez correcta pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de uma dispersão e através da utilização de tensioactivos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser alcançada através da inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação do composto activo na quantidade requerida num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por microfiltração. Geralmente, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários entre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem por vácuo e a secagem por congelação (liofilização), que produzem um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução destes previamente esterilizada por filtração.

A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com um material transportador para produzir uma forma de dosagem unitária variará dependendo do sujeito a tratar e do modo particular de administração. A quantidade de

ingrediente activo que pode ser combinada com um material transportador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade irá variar de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente activo, de preferência de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, de maior preferência de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente activo em combinação com um transportador farmacêuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta óptima desejada (p. ex., uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode ser administrado um único bolo, podem ser administradas ao longo do tempo várias doses divididas ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada tal como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária tal como aqui se utiliza refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a tratar; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dosagem unitárias do invento é ditada por, e directamente dependente de (a) as características únicas do composto activo e do efeito terapêutico particular a alcançar, e (b) as limitações inerentes na técnica de compor um tal composto activo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou no intervalo de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar envolve administração uma vez por semana, uma vez cada duas semanas, uma vez cada três semanas, uma vez cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez cada 3 meses ou uma vez cada três a seis meses. Os

regimes de dosagem preferidos para um anticorpo anti-PTK7 do invento incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal através de administração intravenosa, com o anticorpo a ser administrado utilizando um dos seguintes programas de dosagem: (i) cada quatro semanas durante seis doses, em seguida cada três meses; (ii) cada três semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal de três em três semanas.

Nalguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso em que a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro dos intervalos indicados. O anticorpo é geralmente administrado em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre as doses individuais podem ser, por exemplo, semanais, mensais, cada três meses ou anuais. Os intervalos podem também ser irregulares conforme indicado pela medição dos níveis sanguíneos de anticorpo para o antigénio alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para se obter uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos de cerca de 25-300 µg/ml.

Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de libertação sustida, caso em que é necessária uma administração menos frequente. A dosagem e frequência variam dependendo da semivida do anticorpo no paciente. Em geral, os anticorpos humanos mostram a semivida mais longa, seguidos pelos anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada a intervalos relativamente pouco frequentes ao longo de um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto das suas vidas. Em aplicações terapêuticas é por vezes necessária uma dosagem relativamente elevada a intervalos relativamente curtos, até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada, e de preferência até que o paciente apresente melhoria parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, pode ser administrado ao paciente um regime profilático.

Níveis reais de dosagem dos ingredientes activos nas composições farmacêuticas do presente invento podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente activo que seja eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxica para o paciente. O nível de dosagem seleccionado dependerá de uma variedade de factores farmacocinéticos, incluindo a actividade das composições particulares do presente invento empregues, ou do éster, sal ou amida destas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular a utilizar, da duração do tratamento, de outros fármacos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação com as composições particulares empregues, da idade, do sexo, do peso, da condição, da saúde geral e da história médica anterior do paciente a tratar, e de factores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

Uma "dose terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-PTK7 do invento resulta de preferência numa diminuição na gravidade dos sintomas da doença, num aumento da frequência e duração dos períodos livres de sintomas da doença, ou numa prevenção da insuficiência ou incapacidade devido à aflição da doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores, uma "dose terapeuticamente eficaz" inibe de preferência o crescimento celular ou o crescimento tumoral em pelo menos cerca de 20%, de preferência em pelo menos cerca de 40%, de maior preferência em pelo menos cerca de 60%, e ainda de preferência em pelo menos cerca de 80% relativamente a sujeitos não tratados. A capacidade de um composto para inibir o crescimento tumoral pode ser avaliada num sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada através do exame da capacidade do composto para inibir, tal inibição *in vitro* através de ensaios conhecidos dos peritos na técnica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor, ou de outro modo melhorar os sintomas num sujeito. Um vulgar perito na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em factores tais como o tamanho do sujeito, a gravidade dos sintomas do sujeito, e a composição particular ou via de administração seleccionada.

Uma composição do presente invento pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração utilizando uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Tal como será apreciado pelo perito na técnica, a via e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Vias de administração preferidas para os anticorpos do invento incluem a via de administração intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinal ou outras parentéricas, por exemplo através de injeção ou infusão. A frase "administração parentérica", tal como aqui utilizada, significa modos de administração diferentes da administração entérica e tópica, usualmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intra-espinal, epidural e intrasternal.

Alternativamente, um anticorpo do invento pode ser administrado através de uma via não parentérica, tal como uma via de administração tópica, epidérmica ou mucosa, por exemplo por via intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual ou tópica.

Os compostos activos podem ser preparados com transportadores que protegerão o composto contra libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como etilenoacetato de vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos dos peritos na técnica. Ver, p. ex., "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa

concretização preferida, uma composição terapêutica do invento pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos divulgados nas Patentes U.S. Nos. 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; ou 4596556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis no presente invento incluem: Patente U.S. No. 4487603, que divulga uma bomba de micro-infusão implantável para dispensa de medicação a uma taxa controlada; Patente U.S. No. 4486194, que divulga um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; Patente U.S. No. 4447233, que divulga uma bomba de infusão de medicação para distribuição de medicação a uma taxa de infusão precisa; Patente U.S. No. 4447224, que divulga um aparelho de infusão implantável de caudal variável para distribuição contínua de fármacos; Patente U.S. No. 4439196, que divulga um sistema de distribuição osmótica de fármacos possuindo compartimentos de múltiplas câmaras; e Patente U.S. No. 4475196, que divulga um sistema osmótico de distribuição de fármacos. Muitos outros desses implantes, sistemas de distribuição e módulos são bem conhecidos dos peritos na técnica.

Em certas concretizações, os anticorpos monoclonais humanos do invento podem ser formulados para assegurar uma distribuição correcta *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BHE) exclui muitos compostos altamente hidrófilos. Para assegurar que os compostos terapêuticos do invento atravessam a BHE (se desejado), estes podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de produção de lipossomas, ver, p. ex., Patentes U.S. 4522811; 5374548; e 5399331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são selectivamente transportadas para células ou órgãos específicos, aumentando assim a distribuição direccionada de fármacos (ver, p. ex., V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Porções direccionadoras exemplares incluem folato ou biotina (ver, p. ex., Patente U.S. 5416016 para Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticorpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier et al.

(1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); ver também K. Keinänen, M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123, J.J. Killion, I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

Utilizações e Métodos do Invento

Os anticorpos, composições de anticorpo e métodos do presente invento têm numerosas utilidades de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo*, envolvendo o diagnóstico e tratamento de distúrbios mediados por PTK7. Os anticorpos do presente invento são anticorpos humanos. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas a células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou a sujeitos humanos, p. ex., *in vivo*, para tratar, prevenir e diagnosticar uma variedade de distúrbios. Tal como aqui se utiliza, o termo "sujeito" pretende incluir humanos e animais não humanos. "Animais não humanos" inclui todos os vertebrados, p. ex., mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios e répteis. Sujeitos preferidos incluem pacientes humanos possuindo distúrbios mediados por actividade de PTK7. Os métodos são particularmente adequados para tratamento de pacientes humanos com um distúrbio associado a expressão aberrante de PTK7. Quando os anticorpos para PTK7 são administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados por qualquer ordem ou simultaneamente.

Dada a ligação específica dos anticorpos do invento para PTK7, os anticorpos do invento podem ser utilizados para detectar especificamente a expressão de PTK7 na superfície das células e, além disso, podem ser utilizados para purificar PTK7 através de purificação por imunoafinidade.

O invento proporciona ainda métodos para detecção da presença de antigénio PTK7 humano numa amostra, ou medição da quantidade de antigénio PTK7 humano, compreendendo o contacto da amostra, e de uma amostra de controlo, com um anticorpo monoclonal humano, ou uma porção de ligação ao antigénio deste, que se ligue especificamente a PTK7 humana, sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou uma porção deste e PTK7 humana. É então detectada a formação de um complexo, em que uma diferença na

formação de um complexo entre a amostra em comparação com a amostra de controlo é indicativa da presença de antigénio PTK7 humano na amostra.

PTK7 é expressa em linhas celulares derivadas de carcinoma do cólon, mas não se verificou ser expressa em tecidos do cólon de adultos humanos (Mossie *et al.* (1995) *Oncogene* 11: 2179-84). A expressão de PTK7 foi também observada nalgumas linhas celulares de melanoma e biopsias de melanoma (Easty, *et al.* (1997) *Int. J. Cancer* 71: 1061-5). Além disso, verificou-se que PTK7 é altamente sobre-expressa em amostras de leucemia mielóide aguda (Muller-Tidow *et al.*, (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 1241-9). Um anticorpo anti-PTK7 pode ser utilizado sozinho para inibir o crescimento de tumores cancerosos. Alternativamente, um anticorpo anti-PTK7 pode ser utilizado em conjunto com outros agentes imunogénicos, tratamentos padrão de cancro ou outros anticorpos, tal como descrito abaixo.

Cancros preferidos cujo crescimento pode ser inibido utilizando os anticorpos do invento incluem cancros que tipicamente respondem a imunoterapia. Exemplos não limitantes de cancro preferidos para tratamento incluem cancro do cólon (incluindo cancro do intestino delgado), cancro do pulmão, cancro da mama, cancro do pâncreas, melanoma (p. ex., melanoma maligno metastático), leucemia mielóide aguda, cancro do rim, cancro da bexiga, cancro do ovário e cancro da próstata. Exemplos de outros cancros que podem ser tratados utilizando os métodos do invento incluem cancro renal (p. ex., carcinoma de células renais), glioblastoma, tumores cerebrais, leucemias crónicas ou agudas incluindo leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia de células T do adulto (T-ALL), leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas (p. ex., linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma primário do SNC, linfoma de células T, linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), linfomas cutâneos de células T, linfomas de células nodulares pequenas clivadas, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), cancros linfomas foliculares enteroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas

difusos de células grandes de linhagem B, linfoma de células T semelhante a linfadenopatia angioimunoblástica (AILD) e linfomas baseados em cavidades corporais associadas a VIH), carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (p. ex., tumor de Schmincke), doença de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e outros linfomas de células B, carcinomas nasofaríngeos, cancro ósseo, cancro da pele, cancro da cabeça ou do pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, cancro uterino, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro testicular, cancro uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula tiróide, cancro da glândula paratiróide, cancro da supra-renal, sarcoma de tecido mole, cancro da uretra, cancro do pénis, tumores sólidos da infância, cancro da bexiga, cancro do rim ou uréter, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), angiogénese tumoral, tumor do eixo espinal, glioma do tronco cerebral, adenoma da pituitária, cancro epidermóide, cancro de células escamosas, cancros induzidos ambientalmente incluindo os induzidas pelo amianto, p. ex., mesotelioma, e combinações dos referidos cancros.

Além disso, tendo em conta a expressão da PTK7 em várias células tumorais, os anticorpos humanos, as composições de anticorpo e os métodos do presente invento podem ser utilizados para tratar um sujeito com um distúrbio tumorigénico, p. ex., um distúrbio caracterizado pela presença de células tumorais expressando PTK7 incluindo, por exemplo, cancro do cólon (incluindo cancro do intestino delgado), melanoma (p. ex., melanoma maligno metastático), leucemia mielóide aguda, cancro do pulmão, cancro da mama, cancro da bexiga, cancro do pâncreas, cancro do ovário e cancro da próstata. Exemplos de outros sujeitos com um distúrbio tumorigénico incluem sujeitos com cancro renal (p. ex., carcinoma de células renais), glioblastoma, tumores cerebrais, leucemias crónicas ou agudas, incluindo leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia de células T do adulto (T-ALL), leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas (p. ex.,

linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma primário do SNC, linfoma de células T, linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), linfomas cutâneos de células T, linfomas de células nodulares pequenas clivadas, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), cancros linfomas foliculares enteroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linhagem B, linfoma de células T semelhante a linfadenopatia angioimunoblástica (AILD) e linfomas baseados em cavidades corporais associadas a VIH), carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (p. ex., tumor de Schmincke), doença de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e outros linfomas de células B, carcinomas nasofaríngicos, cancro ósseo, cancro da pele, cancro da cabeça ou do pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, cancro uterino, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro testicular, cancro uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula tiróide, cancro da glândula paratiróide, cancro da glândula supra-renal, sarcoma de tecido mole, cancro da uretra, cancro do pénis, tumores sólidos da infância, cancro da bexiga, cancro do rim ou uréter, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), angiogénese tumoral, tumor do eixo espinal, glioma do tronco cerebral, adenoma da pituitária, cancro epidermóide, carcinoma de células escamosas, cancros induzidos ambientalmente incluindo os induzidas pelo amianto, p. ex., mesotelioma, e combinações dos referidos cancros.

Concordantemente, numa concretização, o invento proporciona um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio do invento para utilização num método de inibição do crescimento de células tumorais num sujeito, o referido método compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido anticorpo ou da porção de ligação ao antigénio.

Os anticorpos (p. ex., anticorpos monoclonais humanos e composições) do invento podem ser utilizados para detectar níveis de PTK7 ou níveis de células que contêm PTK7 à superfície da sua membrana, níveis que podem depois ser ligados a certos sintomas de doença. Alternativamente, os anticorpos podem ser utilizados para inibir ou bloquear a função de PTK7 que, por sua vez, pode ser ligada à prevenção ou melhoria de certos sintomas de doença, implicando assim PTK7 como um mediador da doença. Isto pode ser conseguido fazendo contactar uma amostra experimental e uma amostra de controlo com o anticorpo anti-PTK7 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e PTK7. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e PTK7 são detectados e comparados na amostra experimental e no controlo.

Os anticorpos (p. ex. anticorpos humanos e composições) do invento podem ser inicialmente testados quanto à actividade de ligação associada a utilização terapêutica ou de diagnóstico *in vitro*. Por exemplo, as composições do invento podem ser testadas utilizando os ensaios de citometria de fluxo descritos nos Exemplos abaixo.

Os anticorpos (p. ex., anticorpos humanos, imunoconjugados e composições) do invento podem ter uma utilidade adicional em terapia e diagnóstico de doenças relacionadas com PTK7. Por exemplo, os anticorpos monoclonais humanos e os imunoconjugados podem ser utilizados para desencadear *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes actividades biológicas: para inibir o crescimento de, e/ou matar, uma célula que expresse PTK7; para mediar fagocitose ou ADCC de uma célula que expresse PTK7 na presença de células efectoras humanas; ou para bloquear a ligação do ligando de PTK7 a PTK7.

Os anticorpos (p. ex. anticorpos humanos e composições) podem ser utilizados *in vivo* para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de doenças relacionadas com PTK7. Exemplos de doenças relacionadas com PTK7 incluem, entre outras, cancro do cólon (incluindo cancro do intestino delgado), melanoma (p. ex., melanoma maligno metastático), leucemia mielóide aguda, cancro do pulmão, cancro da mama,

cancro da bexiga, cancro pancreático, cancro do ovário e cancro da próstata.

As vias de administração adequadas das composições de anticorpo (p.ex., anticorpos humanos monoclonais e imunoconjugados) do invento *in vivo* e *in vitro* são bem conhecidas na técnica e podem ser seleccionadas pelos vulgares peritos. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas através de injeção (p. ex., intravenosa ou subcutânea). As dosagens adequadas das moléculas utilizadas dependerão da idade e do peso do sujeito e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpo.

Tal como descrito anteriormente, os anticorpos anti-PTK7 humanos do invento podem ser co-administrados com um ou mais outros agentes terapêuticos, p. ex., um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode ser ligado ao agente (como um imunocomplexo) ou pode ser administrado separado do agente. Neste último caso (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, depois ou simultaneamente com o agente ou pode ser co-administrado com outras terapias conhecidas, p. ex., uma terapia anticancro, p. ex., radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes antineoplásicos, tais como doxorubicina (adriamicina), sulfato de cisplatina-bleomicina, carmustina, clorambucilo e ciclofosfamida hidroxureia, que, por si, só são eficazes a níveis que são tóxicos ou subtóxicos para um paciente. A cisplatina é administrada intravenosamente como uma dose de 100 mg/dose uma vez cada quatro semanas e a adriamicina é administrada intravenosamente numa dose de 60-75 mg/ml, uma vez cada 21 dias. A co-administração de anticorpos anti-PTK7 humanos ou de fragmentos de ligação ao antigénio destes, do presente invento com agentes quimioterapêuticos proporciona dois agentes anticancro que actuam através de mecanismos diferentes, que produzem um efeito citotóxico para células tumorais humanas. Tal co-administração pode resolver problemas devidos ao desenvolvimento de resistência a fármacos ou de uma mudança na antigenicidade das células tumorais que se tornam não reactivas com o anticorpo.

Numa concretização, os imunoconjugados do invento podem ser utilizados para direccionar compostos (p. ex., agentes terapêuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, imunossuppressores, etc.), a células que possuam receptores da superfície celular PTK7, ligando tais compostos ao anticorpo. Por exemplo, um anticorpo anti-PTK7 pode ser conjugado com qualquer um dos compostos toxina descritos nas Patentes U.S. Nos. 6281354 e 6548530, publicações de Patente U.S. Nos. 20030050331, 20030064984, 20030073852 e 20040087497 ou publicado em WO 03/022806. Assim, o invento proporciona também métodos para localização *ex vivo* ou *in vivo* de células que expressem PTK7 (p. ex., com um marcador detectável, tal como um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um cofactor de enzima). Alternativamente, os imunoconjugados podem ser utilizados para matar células que tenham receptores de superfície celular PTK7 direccionando citotoxinas ou radiotoxinas para PTK7.

Células efectoras específicas do alvo, p. ex., células efectoras ligada a composições (p. ex., anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) do invento podem também ser utilizadas como agentes terapêuticos. As células efectoras para direccionamento podem ser leucócitos humanos, tais como macrófagos, neutrófilos ou monócitos. Outras células incluem eosinófilos, células assassinas naturais e outras células que possuam um receptor de IgG ou IgA. Se desejado, as células efectoras podem ser obtidas a partir do sujeito a tratar. As células efectoras específicas do alvo podem ser administradas como uma suspensão de células numa solução fisiologicamente aceitável. O número de células administradas pode ser da ordem de 10^8 - 10^9 mas variará dependendo da finalidade terapêutica. Em geral, a quantidade será suficiente para obter a localização na célula alvo, p. ex., uma célula tumoral expressando PTK7 e efectuar a morte da célula através de, p. ex., fagocitose. As vias de administração podem também variar.

A terapia com células efectoras específicas do alvo pode ser realizada em conjunto com outras técnicas para remoção de células alvo. Por exemplo, a terapia anti-tumoral utilizando as composições (p. ex., anticorpos humanos) do invento e/ou células efectoras armadas com estas composições pode ser

utilizada em conjunto com quimioterapia. Além disso, imunoterapia de combinação pode ser utilizada para dirigir duas populações efectoras citotóxicas distintas para rejeição de células tumorais. Por exemplo, anticorpos anti-PTK7 ligados a anti-Fc-gama RI ou anti-CD3 podem ser utilizados em conjunto com agentes de ligação específicos do receptor de IgG ou IgA.

As composições (p. ex., anticorpos humanos e imunoconjugados) do invento que têm locais de ligação ao complemento, tais como porções de IgG1, 2 ou 3 ou IgM que se ligam ao complemento, podem também ser utilizados na presença de complemento. Numa concretização, o tratamento *ex vivo* de uma população de células compreendendo células alvo com um agente de ligação do invento e células efectoras apropriadas pode ser suplementado através da adição de complemento ou soro contendo complemento. A fagocitose de células alvo revestidas com um agente de ligação do invento pode ser melhorada através da ligação de proteínas do complemento. Noutra concretização, células alvo revestidas com as composições (p. ex., anticorpos humanos) do invento podem também ser lisadas pelo complemento. Ainda noutra concretização, as composições do invento não activam o complemento.

As composições (p. ex., anticorpos humanos e imunoconjugados) do invento podem também ser administradas juntamente com o complemento. Concordantemente, dentro do âmbito do invento estão composições compreendendo anticorpos humanos e soro ou complemento. Estas composições são vantajosas na medida em que o complemento está localizado em estreita proximidade com os anticorpos humanos. Alternativamente, os anticorpos humanos do invento e o complemento ou soro podem ser administrados separadamente.

Consequentemente, aos pacientes tratados com as composições de anticorpo do invento pode ser adicionalmente administrado (antes, simultaneamente ou após a administração de um anticorpo humano do invento) outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico, que melhora ou aumenta o efeito terapêutico dos anticorpos humanos.

Noutras concretizações, o sujeito pode ser adicionalmente tratado com um agente que module, p. ex., aumente ou iniba, a expressão ou actividade dos receptores Fc γ ou Fc γ , por exemplo, através do tratamento do sujeito com uma citocina. As citocinas preferidas para administração durante o tratamento com a molécula multiespecífica incluem factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF), factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferão- γ (IFN- γ) e factor de necrose tumoral (TNF).

As composições (p. ex., anticorpos humanos) do invento podem também ser utilizadas para direccionar células expressando Fc γ R ou PTK7, por exemplo para marcação de tais células. Para tal utilização, o agente de ligação pode ser ligado a uma molécula que pode ser detectada. Assim, o invento proporciona métodos para localização *ex vivo* ou *in vitro* de células que expressam receptores de Fc, tais como Fc γ R ou PTK7. O marcador detectável pode ser, p. ex., um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um cofactor de enzima.

Também dentro do âmbito do presente invento estão estojos compreendendo as composições de anticorpo do invento (p. ex., anticorpos humanos ou imunoconjugados) e instruções de utilização. O estojo pode ainda conter um ou mais reagentes adicionais, tais como um reagente imunossupressor, um agente citotóxico, ou um agente radiotóxico ou um ou mais anticorpos humanos adicionais do invento (p. ex., um anticorpo humano possuindo uma actividade complementar que se liga a um epitopo no antigénio PTK7 distinto do primeiro anticorpo humano). Os estojos incluem tipicamente um marcador indicando a utilização pretendida dos componentes do estojo. O termo marcador inclui qualquer material escrito ou registado fornecido no ou com o estojo, ou que de outro modo acompanhe o estojo.

O presente invento é ainda ilustrado pelos seguintes exemplos que não devem ser entendidos como maior limitação.

Exemplos

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos Contra PTK7Antigénio

Os protocolos de imunização utilizaram como antigénio tanto (i) uma proteína de fusão recombinante compreendendo a porção extracelular de PTK7 com uma etiqueta myc e his como (ii) a PTK7 inteira ligada à membrana. Ambos os antigénios foram gerados através de métodos de transfecção recombinantes numa linha celular CHO.

Ratinhos Transgénicos HuMab e KM[™]

Anticorpos monoclonais totalmente humanos para PTK7 foram preparados utilizando as estirpes HCo7 e HCo12 de ratinhos transgénicos HuMab e a estirpe de ratinhos transgénicos transcromossómicos KM, cada uma das quais expressa genes de anticorpos humanos. Em cada uma destas estirpes de ratinho, o gene da cadeia leve capa de ratinho endógeno foi interrompido homozigoticamente tal como descrito em Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 811-820 e o gene da cadeia pesada de ratinho endógeno foi interrompido homozigoticamente tal como descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Cada uma destas estirpes de ratinho possui um transgene da cadeia leve capa humana, KCo5, tal como descrito em Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. A estirpe HCo7 possui o transgene da cadeia pesada humana HCo7, tal como descrito nas Patentes U.S. Nos. 5770429; 5545806; 5625825; e 5545807. A estirpe HCo12 possui o transgene da cadeia pesada humana HCo12 tal como descrito no Exemplo 2 de WO 01/09187 ou Exemplo 2 de WO 01/14424. A estirpe KM contém o transcromossoma SC20 tal como descrito na Publicação PCT WO 02/43478.

Imunizações de HuMab e KM:

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para PTK7, ratinhos HuMab e ratinhos KM[™] foram imunizados com proteína de fusão PTK7 recombinante purificada e células CHO transfectadas com PTK7 como antigénio. Esquemas gerais de imunização para ratinhos HuMab são descritos em Lonberg, N.

et al., (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 e Publicação PCT WO 98/24884. Os ratinhos tinham 6-16 semanas de idade após a primeira infusão de antigénio. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) de antigénio proteína de fusão de PTK7 e $5-10 \times 10^6$ células foram utilizadas para imunizar os ratinhos HuMab e ratinhos KM[™] por via intraperitoneal, subcutânea (Sc) ou através de injeção na pata.

Os ratinhos transgénicos foram imunizados duas vezes com antigénio em adjuvante completo de Freund ou adjuvante de Ribi IP, seguido por 3-21 dias IP (até um total de 11 imunizações) com o antigénio em adjuvante incompleto de Freund ou Ribi. A resposta imunitária foi monitorizada através de sangrias retro-orbitais. O plasma foi pesquisado através de ELISA (tal como descrito abaixo), e os ratinhos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-PTK7 foram utilizados para fusões. Os ratinhos foram reforçados por via intravenosa com antigénio 3 dias antes do sacrifício e da remoção do baço. Tipicamente, foram realizadas 10-35 fusões para cada antigénio. Várias dezenas de ratinhos foram imunizadas para cada antigénio.

Seleccção de Ratinhos HuMab ou KM[™] Produtores de Anticorpos Anti-PTK7:

Para seleccionar ratinhos HuMab ou KM[™] produtores de anticorpos que se ligam a PTK7, os soros dos ratinhos imunizados foram testados através de ELISA tal como descrito por Fishwild, D. et al. (1996). Resumidamente, placas de microtitulação foram revestidas com proteína de fusão de PTK7 recombinante purificada a partir de células CHO transfectadas com 1-2 µg/ml em PBS, 100 µl/poço incubadas a 4°C de um dia para o outro, em seguida bloqueadas com 200 µl/poço de soro fetal bovino a 5% em PBS/Tween (0,05%). As diluições de soros de ratinhos imunizados com PTK7 foram adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram reveladas com o substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas

através de espectrofotometria a uma DO 415-495. Os ratinhos que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos anti-PTK7 foram utilizados para fusões. As fusões foram realizadas tal como descrito abaixo e os sobrenadantes dos hibridomas foram testados quanto à actividade anti-PTK7 através de ELISA.

Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos para PTK7:

Os esplenócitos de ratinho, isolados a partir de ratinhos HuMab, foram fundidos com PEG com uma linha de células de mieloma de ratinho com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes foram então pesquisados quanto à produção de anticorpos específicos do antigénio. Suspensões de células individuais de esplenócitos de ratinhos imunizados foram fundidas com um quarto do número de células SP2/0 de mieloma de ratinho não secretoras (ATCC, CRL 1581) com PEG a 50% (Sigma). As células foram plaqueadas a aproximadamente 1×10^5 /poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguido de cerca de duas semanas de incubação em meio selectivo contendo 10% de soro fetal bovino a 10%, meio condicionado com P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) a 10%, Origen (IGEN) a 3-5% em DMEM (Mediatech, CRL 10013, rico em glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina e HAT $1 \times$ (Sigma, P-7185 CRL). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual o HAT foi substituído por HT. Os poços individuais foram então pesquisados através de ELISA (descrito acima) para anticorpos monoclonais IgG anti-PTK7 humanos. Uma vez ocorrido um crescimento extensivo do hibridoma, o meio foi monitorizado normalmente após 10-14 dias. Os hibridomas não secretoras de anticorpo foram novamente plaqueados, pesquisados novamente e, se ainda positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-PTK7 foram subclonados pelo menos duas vezes através de diluição limitante. Os sub- clones estáveis foram então cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para melhor caracterização.

Os clones dos hibridomas 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 foram seleccionados para mais análises.

Exemplo 2: Caracterização Estrutural dos Anticorpos Monoclonais Humanos 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8

As sequências de ADNc codificando as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8 foram obtidas a partir dos hibridomas 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a e 7C8, respectivamente, utilizando técnicas de PCR padrão e foram sequenciadas utilizando técnicas de sequenciação de ADN padrão.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de 3G8 são mostradas na Figura 1A e em SEQ ID NO: 41 e 1, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável da cadeia leve de 3G8 são mostradas na Figura 1B e em SEQ ID NO: 45 e 5, respectivamente.

A comparação da sequência da cadeia pesada da imunoglobulina 3G8 com as sequências conhecidas de cadeia pesada de imunoglobulinas humanas da linha germinativa demonstrou que a cadeia pesada de 3G8 utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH 3-30.3, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linha germinativa humana JH 4b. O alinhamento da sequência de VH de 3G8 com a sequência da linha germinativa VH 3-30.3 é mostrado na Figura 5. Uma análise posterior da sequência de VH de 3G8 utilizando o sistema de determinação da região CDR de Kabat levou à delineação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia pesada, tal como mostrado nas Figuras 1A e 5, e em SEQ ID NOS: 11, 15 e 19, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia leve da imunoglobulina 3G8 com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 3G8 utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK L15 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 1. O alinhamento da sequência de VL de

3G8 com a sequência da linha germinativa VK L15 é mostrado na Figura 9. Uma análise posterior da sequência de VL de 3G8 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 1B e 9, e em SEQ ID NOs: 23, 29 e 35, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 3G8a são mostradas na Figura 1A e em SEQ ID NO: 41 e 1, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 3G8a são mostradas na Figura 1C e em SEQ ID NO: 46 e 6, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia pesada da imunoglobulina 3G8a com as sequências de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 3G8a utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH 3-30.3, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linha germinativa humana JH 4b. O alinhamento da sequência de VH de 3G8a com a sequência da linha germinativa VH 3-30.3 é mostrado na Figura 5. Uma análise posterior da sequência de VH de 3G8a utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tal como mostrado na Figuras 1A e 5, e em SEQ ID NOs: 11, 15 e 19, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia leve da imunoglobulina 3G8a com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 3G8a utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK L15 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 3. O alinhamento da sequência de VL de 3G8a com a sequência da linha germinativa VK L15 é mostrado na Figura 9. Uma análise posterior da sequência de VL de 3G8a utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 1C e 9, e em SEQ ID NOs: 24, 30 e 36, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 4D5 são mostradas na Figura 2A e em SEQ ID NO: 42 e 2, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 4D5 são mostradas na Figura 2B e em SEQ ID NO: 47 e 7, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia pesada da imunoglobulina 4D5 com as sequências de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 4D5 utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH 3-30.3, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linha germinativa humana JH 4b. O alinhamento da sequência de VH de 4D5 com a sequência da linha germinativa VH 3-30.3 é mostrado na Figura 6. Uma análise posterior da sequência de VH de 4D5 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tal como mostrado nas Figuras 2A e 6, e em SEQ ID NOs: 12, 16 e 20, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia leve da imunoglobulina 4D5 com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 4D5 utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK A10 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 5. O alinhamento da sequência de VL de 4D5 com a sequência da linha germinativa VK A10 é mostrado na Figura 10. Uma análise posterior da sequência de VL de 4D5 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 2B e 10, e em SEQ ID NOs: 25, 31 e 37, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de 12C6 são mostradas na Figura 3A e em SEQ ID NO: 43 e 3, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável da cadeia leve de 12C6 são mostradas na Figura 3B e em SEQ ID NO: 48 e 8, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia pesada de imunoglobulina de 12C6 com as sequências de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 12C6 utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH DP44, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linha germinativa humana JH 4b. O alinhamento da sequência VH de 12C6 com a sequência da linha germinativa VH DP44 é mostrado na Figura 7. Uma análise posterior da sequência VH de 12C6 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tal como mostrado nas Figuras 3A e 7, e em SEQ ID NOs: 13, 17 e 21, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina da cadeia leve de 12C6 com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 12C6 utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK A27 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 2. O alinhamento da sequência de VL de 12C6 com a sequência da linha germinativa VK A27 é mostrado na Figura 11. Uma análise posterior da sequência de VL de 12C6 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 3B e 11, e em SEQ ID NOs: 26, 32 e 38, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12C6a são mostradas na Figura 3A e em SEQ ID NO: 43 e 3, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12C6a são mostradas na Figura 3C e em SEQ ID NO: 49 e 9, respectivamente.

A comparação da sequência da cadeia pesada da imunoglobulina 12C6a com as sequências de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 12C6a utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH DP44, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linha germinativa humana

JH 4b. O alinhamento da sequência de VH de 12C6a com a sequência da linha germinativa VH DP44 é mostrado na Figura 7. Uma análise posterior da sequência de VH de 12C6a utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delineação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia pesada tal como mostrado nas Figuras 3A e 7, e em SEQ ID NOs: 13, 17 e 21, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia leve da imunoglobulina 12C6a com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 12C6a utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK L15 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 2. O alinhamento da sequência de VL de 12C6a com a sequência da linha germinativa VK L15 é mostrado na Figura 12. Uma análise posterior da sequência de VL de 12C6a utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delineação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 3C e 12, e em SEQ ID NOs: 27, 33 e 39, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 7C8 são mostradas na Figura 4A e em SEQ ID NO: 44 e 4, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7C8 são mostradas na Figura 4B e em SEQ ID NO: 50 e 10, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia pesada da imunoglobulina 7C8 com as sequências de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 7C8 utiliza um segmento VH da linha germinativa humana VH 3-33, um segmento D da linha germinativa humana 3-10, e um segmento JH da linha germinativa humana JH 6b. O alinhamento da sequência de VH de 7C8 com a sequência da linha germinativa VH 3-33 é mostrado na Figura 8. Uma análise posterior da sequência de VH de 7C8 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delineação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia pesada tal como mostrado nas Figuras 4A e 8, e em SEQ ID NOs: 14, 18 e 22, respectivamente.

A comparação da sequência de cadeia leve da imunoglobulina 7C8 com as sequências de cadeias leves de imunoglobulinas humanas da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 7C8 utiliza um segmento VL da linha germinativa humana VK L6 e um segmento JK da linha germinativa humana JK 3. O alinhamento da sequência de VL de 7C8 com a sequência da linha germinativa VK L6 é mostrado na Figura 13. Uma análise posterior da sequência de VL de 7C8 utilizando o sistema de Kabat de determinação das regiões CDR conduziu à delineação das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tal como mostrado nas Figuras 4B e 13, e em SEQ ID NOs: 28, 34 e 40, respectivamente.

Exemplo 3: Mutação de mAb 12C6 e Utilização Alternativa da Linha Germinativa

Tal como discutido no Exemplo 2 acima, os anticorpos monoclonais 12C6 e 12C6a utilizam uma região variável da cadeia pesada derivada de uma sequência da linha germinativa humana DP-44 presente no transgene HCo7 da estirpe de Ratinho HuMab®. Uma vez que DP-44 não é uma sequência da linha germinativa que seja utilizada no repertório de imunoglobulinas humanas nativas, pode ser vantajoso mutar a sequência de VH de 12C6 e 12C6a para reduzir uma potencial imunogenicidade. De preferência, um ou mais resíduos estruturais da sequência de VH de 12C6 ou 12C6a são mutados num resíduo ou resíduos presentes na estrutura de uma sequência de VH estruturalmente aparentada da linha germinativa que seja utilizada no repertório de imunoglobulinas humanas nativas. Por exemplo, a Figura 7 mostra o alinhamento da sequência de VH de 12C6 e 12C6a com a sequência da linha germinativa DP44 e também com duas sequências humanas da linha germinativa estruturalmente aparentadas, VH 3-23 e VH 3-7. Dada a relação destas sequências, é possível prever que se pode seleccionar um anticorpo humano que se ligue especificamente a PTK7 humana e que utilize uma região VH derivada de uma sequência da linha germinativa VH 3-23 ou VH 3-7. Além disso, pode-se transformar um ou mais resíduos dentro da sequência de VH de 12C6 ou 12C6a que difiram da do resíduo ou dos resíduos na posição comparável na sequência de VH de 3-23 ou VH de 3-7 no

resíduo ou nos resíduos que estão presentes na VH de 3-23 ou VH de 3-7, ou numa substituição de aminoácidos conservativa destas.

Exemplo 4: Caracterização da Especificidade de Ligação e Cinética de Ligação de Anticorpos Monoclonais Humanos Anti-PTK7

Neste exemplo, a afinidade de ligação e a cinética de ligação dos anticorpos anti-PTK7 foram examinados através de análise Biacore. A especificidade de ligação, e a competição cruzada foram examinadas através de citometria de fluxo.

Especificidade de ligação através de citometria de fluxo

Linhas celulares HEK3 que expressam PTK7 humana recombinante na superfície celular foram desenvolvidas e utilizadas para determinar a especificidade de anticorpos monoclonais humanos de PTK7 através de citometria de fluxo. As células HEK3 foram transfectadas com plasmídeos de expressão contendo ADNc inteiro codificando formas transmembranares de PTK7. A ligação do anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 7C8 foi avaliada através de incubação das células transfectadas com o anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 a uma concentração de 10 µg/ml. As células foram lavadas e a ligação foi detectada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Os resultados estão representados nas Figuras 14. O anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 7C8 ligou-se às células HEK3 transfectadas com PTK7 mas não a células HEK3 que não foram transfectadas com PTK7 humana. Estes dados demonstram a especificidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 para PTK7.

Especificidade de Ligação através de ELISA

A ligação de anticorpos anti-PTK7 foi também avaliada através de ELISA padrão para examinar a especificidade da ligação a PTK7.

O domínio extracelular recombinante de PTK7 foi testado quanto à ligação contra os anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 3G8, 4D5, 12C6 e 12C6a a diferentes concentrações. Foram efectuados procedimentos ELISA padrão. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 foram adicionados a uma concentração de partida de 10 µg/ml e diluídos em série a uma diluição de 1:2. Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico da cadeia capa) conjugado com peroxidase de rábano (HRP) foi utilizado como anticorpo secundário. Os resultados são mostrados na Figura 15. Cada um dos anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 3G8, 4D5, 12C6 e 12C6a ligou-se a PTK7. Estes dados demonstram a especificidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 para PTK7.

Mapeamento de Epitopos dos Anticorpos Anti-PTK7

Foi utilizada citometria de fluxo para determinar o agrupamento de epitopos de HuMAb anti-PTK7. Células de tumor de Wilms G-401 (No. de Acesso ATCC CRL-1441) foram transfectadas com plasmídeos de expressão contendo ADNc inteiro codificando formas transmembranares de PTK7. A ligação ao epitopo de cada anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 foi avaliada através de incubação de 1×10^5 células transfectadas com 10 µg/ml de anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 frio, lavagem, seguido de adição de 10 µg/ml de um anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 conjugado com fluorescência. A ligação foi detectada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. Análises de citometria de fluxo foram efectuadas utilizando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Após análise dos dados, os anticorpos anti-PTK7 foram categorizados em 3 grupos de epitopos - grupo A, que inclui 7D11, grupo B, que inclui 3G8 e 3G8a e grupo C, que inclui 7C8, 12C6 e 12C6a.

Exemplo 5: Caracterização da ligação do anticorpo anti-PTK7 a PTK7 expressa na superfície de células de cancro humano

A linha celular do tumor nefroblastoma de Wilms G-401 (No. de Ac. ATCC CRL-1441) foi testada quanto à ligação dos anticorpos monoclonais humanos HuMAb anti-PTK7 12C6 e 7C8 a diferentes concentrações. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 foi avaliada através de

incubação de 1×10^5 células com o anticorpo a uma concentração inicial de 30 mg/ml e diluindo em série o anticorpo a uma diluição de 1:10. As células foram lavadas e a ligação foi detectada com um Ac anti-IgG humana marcado com PE. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Os resultados são mostrados na Figura 16. Os anticorpos monoclonais anti-PTK7 12C6 e 7C8 ligaram-se à linha celular do tumor nefroblastoma de Wilms de um modo dependente da concentração, medido através da intensidade média de fluorescência (IMF) da coloração. Os valores de CE_{50} para os anticorpos monoclonais anti-PTK7 12C6 e 7C8 foram de 4,035 nM e 3,428 nM, respectivamente.

Estes dados demonstram que os HuMAb anti-PTK7 se ligam a linhas celulares de cancro do rim.

Exemplo 6: Ligação do anticorpo anti-PTK7 humano a linhas celulares de cancro

Os anticorpos anti-PTK7 foram testados quanto à ligação a uma variedade de linhas celulares de cancro através de citometria de fluxo.

A ligação dos anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 3G8, 12C6a, 4D5 e 12C6 a um painel de linhas celulares de cancro foi avaliada através de incubação de linhas celulares de cancro com anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 a uma concentração de 10 µg/ml. As linhas celulares de cancro que foram testadas foram A-431 (No. de Ac. ATCC CRL-1555), células de tumor de Wilms G-401 (No. de Ac. ATCC CRL-1441), Saos-2 (No. de Ac. ATCC HTB-85), SKOV-3 (No. de Ac. ATCC HTB-77), PC3 (No. de Ac. ATCC CRL-1435), DMS 114 (No. de Ac. ATCC CRL-2066), ACHN (No. de Ac. ATCC CRL-1611), LNCaP (No. de Ac. ATCC CRL-1740), DU 145 (No. de Ac. ATCC HTB-81), LoVo (No. de Ac. ATCC CCL-229) e MIA PaCa-2 (No. de Ac. ATCC CRL-1420). Um anticorpo de controlo do isotipo foi utilizado como controlo negativo. As células foram lavadas e a ligação foi detectada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Os resultados são mostrados nas Figuras 17. Os anticorpos

monoclonais anti-PTK7 3G8, 12C6a, 4D5 e 12C6 ligaram-se às linhas celulares de cancro A-431, células de tumor de Wilms G-401, Saos-2, SKOV-3, PC3, DMS 114, ACHN, LNCaP, DU 145, LoVo e MIA PaCa-2, medido através da intensidade média de fluorescência (IMF) da coloração. Estes dados demonstram que os HuMAb anti-PTK7 se ligam a uma variedade de células de cancro que expressam PTK7 na superfície celular.

Exemplo 7: Ligação de anti-PTK7 a células T, B e dendríticas humanas

Os anticorpos anti-PTK7 foram testados quanto à ligação a células T CD4+, CD8+, células B CD19+ e células dendríticas mielóides do sangue humano expressando PTK7 na sua superfície celular através de citometria de fluxo.

As células T humanas foram activadas através de anticorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PTK7 nas células T antes de se ligarem a um anticorpo monoclonal anti-PTK7 humano. A ligação do anticorpo monoclonal humano anti-PTK7 7c8 foi avaliada através da incubação das células com os anticorpos monoclonais humanos anti-PTK7 a uma concentração de 10 µg/ml. Nalgumas experiências, um anticorpo conhecido que se liga a um marcador específico de células T e B foi utilizado como controlo positivo. As células foram lavadas e a ligação foi detectada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Os resultados são mostrados nas Figuras 18 (células T e células B humanas activadas) e 19 (células dendríticas). O anticorpo monoclonal anti-PTK7 7C8 ligou-se a células T CD4+ e CD8+ e células dendríticas humanas activadas, mas não a células B, medido através da intensidade média de fluorescência (IMF) da coloração. Estes dados demonstram que os HuMAb anti-PTK7 se ligam a células T humanas e células dendríticas.

Exemplo 8: Internalização do anticorpo monoclonal anti-PTK7

Os HuMAb anti-PTK7 foram testados quanto à capacidade para se internalizarem em linhas celulares expressando PTK7 utilizando um ensaio de internalização Hum-Zap. O ensaio Hum-

Zap testa a internalização de um anticorpo humano primário através da ligação de um anticorpo secundário com afinidade para IgG humana conjugada com a toxina saporina.

As linhas celulares de cancro expressando PTK7 do tumor de Wilms G-401 (No. de Ac. ATCC CRL-1441), A-431 (No. de Ac. ATCC CRL-1555) e PC3 (No. de Ac. ATCC CRL-1435) foram semeadas a 1×10^4 células/poço em poços de 100 μ l directamente. Os anticorpos HuMab anti-PTK7 3G8, 4D5, 12C6 ou 7C8 foram adicionados aos poços a uma concentração inicial de 30 nM e titulados em diluições em série de 1:3. Um anticorpo de controlo de isotipo, que é não específico para PTK7, foi utilizado como controlo negativo. O Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, TI-22-25) foi adicionado a uma concentração de 11 nM e as placas foram deixadas a incubar durante 72 horas. As placas foram então pulsadas com 1,0 μ Ci de 3 H-timidina durante 24 horas, colhidas e lidas num Contador de Cintilações Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Os resultados são mostrados nas Figuras 20A-D. Os anticorpos anti-PTK7 3G8, 4D5, 7C8 e 12C6 mostraram uma diminuição dependente da concentração de anticorpo na incorporação de 3 H-timidina na linha celular de cancro do tumor de Wilms expressando PTK7. Os anticorpos anti-PTK7 12C6 e 7C8 mostraram uma diminuição dependente da concentração de anticorpo na incorporação de 3 H-timidina nas linhas celulares de cancro expressando PTK7 A-431 e PC3. O valor de CE_{50} para os anticorpos anti-PTK7 3G8, 4D5, 12C6 e 7C8 em células de tumor de Wilms foi de 0,6437 nM, 0,2516 nM, 0,2053 nM e 0,1788 nM, respectivamente. O valor de CE_{50} para os anticorpos anti-PTK7 12C6 e 7C8 em células A-431 foi de 0,1657 nM e 0,1826 nM, respectivamente. O valor de CE_{50} para os anticorpos anti-PTK7 12C6 e 7C8 em células tumorais PC3 foi de 0,3175 nM e 0,2648 nM, respectivamente. Estes dados demonstram que os anticorpos anti-PTK7 3G8, 4D5, 12C6 e 7C8 se internalizam em células de cancro.

Exemplo 9: Avaliação de morte celular de um anticorpo anti-PTK7 conjugado com uma toxina sobre linhas celulares de cancro humanas

Neste exemplo, anticorpos monoclonais anti-PTK7 conjugados com uma toxina foram testados quanto à capacidade

de matar linhas celulares de cancro humanas PTK7+ num ensaio de proliferação celular.

O anticorpo HuMab anti-PTK7 12C6a foi conjugado com uma toxina através de um ligador, tal como um ligador peptídico, hidrazona ou dissulfureto. Exemplos de compostos toxinas que podem ser conjugados com os anticorpos do presente invento são descritos em WO 2007/038658. A linha celular de cancro renal humano do tumor de Wilms expressando PTK7 G-401 (No. de Ac. ATCC CRL-1441) foi semeada a 10^4 células/poço em poços de 100 μ l durante 3 horas. Um conjugado anticorpo anti-PTK7-toxina foi adicionado aos poços a uma concentração inicial de 100 nM e titulado em diluições em série até 1:3. As placas foram deixadas a incubar durante 48 horas. As placas foram então pulsadas com 1 μ Ci de 3 H-timidina durante 24 horas antes do término da cultura, colhidas e lidas num Contador de Cintilações Top Count (Packard Instruments). A Figura 21 mostra os efeitos do conjugado de 12C6a nas células de tumor de Wilms. O anticorpo anti-PTK7 12C6a mostrou uma diminuição dependente da concentração de anticorpo-toxina na incorporação de 3 H-timidina na linha celular de cancro renal humano do tumor de Wilms expressando PTK7.

Estes dados demonstram que os anticorpos anti-PTK7 conjugados com toxina mostram citotoxicidade específica para as células de cancro renal humano.

Exemplo 10: Avaliação de morte celular de um anticorpo anti-PTK7 conjugado com toxina em linhas celulares de tumor humanas

Neste exemplo, anticorpos monoclonais anti-PTK7 conjugados com uma toxina foram testados quanto à capacidade de matar linhas celulares de tumor humanas PTK7⁺ possuindo expressão de PTK7 na superfície celular baixa, intermédia ou alta num ensaio de proliferação celular.

O anticorpo HuMab anti-PTK7 12C6a foi conjugado com uma toxina através de um ligador, tal como um ligador peptídico, hidrazona ou dissulfureto. Exemplos de compostos de toxinas que podem ser conjugados com os anticorpos do presente invento são descritos em WO 2007/038658. As linhas celulares

de cancro de tumores humanos expressando PTK7 A-431, SKOV3 e LoVo foram semeadas a 10^4 células/poço em poços de 100 μ l. As linhas celulares foram previamente testadas quanto à expressão de PTK7 na superfície celular num ensaio FACS padrão. A linha celular A-431 expressou o nível mais elevado de expressão na superfície celular de PTK7 e a linha celular LoVo expressou o nível mais baixo de expressão na superfície celular de PTK7. Um conjugado de anticorpo anti-PTK7-toxina foi adicionado aos poços a uma concentração inicial de 20 nM e titulado em diluições em série até 1:2. Um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como controlo negativo. As placas foram deixadas a incubar durante 3 horas e os conjugados anticorpo-toxina não ligados (livres) foram lavados. As placas continuaram a incubar durante 96 horas e a actividade de morte (UF, unidade fluorescente) foi medida através da viabilidade celular em ensaio Luminescente CellTiter-Glo[®] de acordo com o protocolo (Promega, WI, EUA, Boletim técnico No. 288) utilizando um leitor BIO-TEK (Bio-Tek Instruments, Inc, VT, USA). Os resultados são mostrados na Figura 22. O conjugado anti-PTK7-toxina mostrou uma diminuição dependente da concentração de anticorpo-toxina no ensaio de proliferação em A431^{alta}, SKOV3^{inter}, e LoVo^{baixa} expressando PTK7.

Estes dados demonstram que os anticorpos anti-PTK7 conjugados com toxina mostram citotoxicidade específica para várias células de cancro humanas.

Exemplo 11: Imuno-histoquímica com 3G8, 12C6a, 2E11

A capacidade dos HuMAb anti-PTK7 3G8, 12C6a, e 2E11 para reconhecerem PTK7 através de imuno-histoquímica foi examinada utilizando biopsias clínicas de cancro do pulmão, cancro da mama, cancro da bexiga, cancro pancreático, cancro do cólon, cancro do ovário, cancro do intestino delgado e cancro da próstata.

Para imuno-histoquímica, foram utilizadas secções congeladas de 5 μ m (Ardais Inc, EUA). Após secagem durante 30 minutos, as secções foram fixadas com acetona (à temperatura ambiente durante 10 minutos) e secas ao ar durante 5 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e, em seguida, pré-incubadas

com soro de cabra normal a 10% em PBS durante 20 minutos e subsequentemente incubadas com 10 µg/ml de anticorpo com FITC em PBS com soro de cabra normal a 10% durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante 30 min com anti-FITC de ratinho (DAKO 10 µg/ml) à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente com PBS e incubadas anti-ratinho de cabra conjugado com HRP (DAKO) durante 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente 3× com PBS. Diaminobenzidina (Sigma) foi utilizada como substrato, resultando em coloração castanha. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram contrastadas com hematoxilina durante 1 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas durante 10 s em água destilada corrente e montadas em glycergel (Dako). A coloração imuno-histoquímica das biopsias clínicas mostrou coloração positiva em seções de cancro do pulmão, cancro da mama, cancro da bexiga, cancro pancreático, cancro do cólon, cancro do ovário, cancro do intestino delgado e cancro de próstata. O tecido normal foi sempre negativo para a coloração de PTK7, enquanto dentro do tecido maligno, observou-se que tanto os fibroblastos activados por cancro como as células epiteliais de cancro eram positivos para coloração de PTK7. A identidade dos fibroblastos activados por cancro foi confirmada em seções de cancro de bexiga e cancro de mama através de coloração com um anticorpo da Proteína de Activação de Fibroblastos (FAP, Alexis Biochemicals, San Diego, EUA). FAP é um marcador conhecido de fibroblastos activados por cancro (Hofheinz et al. (2003) *Oncologie* 26: 44-48).

Exemplo 12: Ensaio de invasão

Neste exemplo, anticorpos dirigidos contra PTK7 foram testados quanto à capacidade para afectar a invasão celular na linha de células CHO transfectadas com PTK7. O ensaio foi feito utilizando um HTS 96-Multiwell Insert System (Cat # 351162, BD Biosciences, CA) de acordo com o protocolo. Uma linha de células CHO parental, células CHO transfectadas com PTK7 inteira ou uma linha de células de controlo HEK293 foi misturada com um banco de HuMab anti-PTK7 ou um anticorpo de controlo do isotipo antes da adição das células nas inserções. A mistura (células + banco de Ac) foi adicionada a

um poço de inserção na placa de invasão. Após incubação a 37°C com CO₂ a 5% durante 24 horas, as células foram marcadas com um corante fluorescente e as células que invadiram a parte inferior da membrana foram quantificadas utilizando um leitor de fluorescência de placas. Os resultados são mostrados na Figura 23. Estes dados demonstram que os anticorpos anti-PTK7 inibem a mobilidade de invasão de células expressando PTK7 na superfície celular.

Exemplo 13: Tratamento do modelo in vivo de xenoenxerto de cancro do pâncreas utilizando anticorpos anti-PTK7 nus e conjugados com citotoxina

Este Exemplo descreve o tratamento *in vivo* de ratinhos implantados com um tumor carcinoma de células pancreáticas com anticorpos anti-PTK7 conjugados com toxina para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos no crescimento tumoral.

Células HPAC (adenocarcinoma pancreático humano, Número de Acesso ATCC CRL-2119) ou outras de cancro pancreático adequadas foram expandidas *in vitro* utilizando procedimentos laboratoriais padrão. Ratinhos nus atímicos Ncr machos (Taconic, Hudson, NY) entre 6-8 semanas de idade foram implantados subcutaneamente no flanco direito com $2,5 \times 10^6$ células HPAC em 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratinho. Os ratinhos foram pesados e medidos quanto às três dimensões dos tumores utilizando um paquímetro electrónico duas vezes por semana após a implantação. Os volumes tumorais foram calculados como altura \times largura \times comprimento/2. Os ratinhos com tumores HPAC com 90 mm³ em média foram distribuídos aleatoriamente em grupos de tratamento. Aos ratinhos foi administrada uma dose única intravenosa com veículo de PBS, anticorpo anti-PTK7 nu ou HuMAb anti-PTK7 conjugado com toxina no Dia 0 na dosagem indicada (μ mol/kg). Exemplos de compostos toxina que podem ser conjugados com os anticorpos do presente invento foram descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. número 2006/0024317 A1 pendente. Os ratinhos foram monitorizados quanto ao crescimento tumoral durante 61 dias após a dosagem. Os ratinhos foram sujeitos a eutanásia quando os tumores atingiam o ponto final (2000 mm³) ou ulceravam. Os anticorpos anti-PTK7 conjugados com uma toxina retardaram a progressão do crescimento tumoral. Os resultados

são mostrados na Figura 24. O efeito anti-tumoral do anti-PTK7 conjugado com toxina foi dependente da dose, com o maior efeito observado a uma dose de 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. O tratamento com o conjugado anti-PTK7-toxina foi bem tolerado, com sujeitos que nunca experimentaram uma perda de peso corporal mediana superior a 5% (dados não mostrados). Assim, o tratamento com um conjugado anticorpo anti-PTK7-toxina tem um efeito inibitório *in vivo* directo no crescimento tumoral do cancro do pâncreas.

Exemplo 14: Tratamento do modelo *in vivo* de xenoenxerto de células de cancro de mama utilizando anticorpos anti-PTK7 nus e conjugados com citotoxina

Este Exemplo divulga o tratamento *in vivo* de ratinhos implantados com um tumor de carcinoma da mama resistente a adriamicina com anticorpos anti-PTK7 conjugados com toxina para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos no crescimento tumoral.

MCF7-adr (linha celular de cancro da mama humano resistente a adriamicina) foi expandida *in vitro* utilizando procedimentos laboratoriais padrão. Ratinhos CB17.SCID fêmeas (Taconic, Hudson, NY) entre 6-8 semanas de idade, foram implantados por via subcutânea com 1,7 mg de grânulos de estrogénio de libertação em 90 dias, 3,0 mm de tamanho (Innovative Research of America, Sarasota, FL) na região do pescoço um dia antes de serem implantados por via subcutânea no flanco direito com 10×10^6 células MCF7-Adr em 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratinho. Os ratinhos foram pesados e medidos quanto à tridimensionalidade dos tumores utilizando um paquímetro electrónico duas vezes por semana após a implantação. O volume dos tumores foi calculado como altura \times largura \times comprimento/2. Os ratinhos com tumores MCF7-adr tendo 160 mm³ em média, foram distribuídos aleatoriamente por grupos de tratamento. Aos ratinhos foi administrada uma única dose intravenosa a 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ com veículo de PBS, anticorpo anti-PTK7 nu ou HuMAb anti-PTK7 conjugado com toxina no Dia 0. Exemplos de compostos toxinas que podem ser conjugados com os anticorpos do presente invento foram descritos no Pedido de Patente U.S. número 2006/0024317 A1 pendente. Os ratinhos foram monitorizados quanto ao crescimento tumoral durante 63

dias após a dosagem. Os ratinhos foram sujeitos a eutanásia quando os tumores estavam ulcerados. Os resultados são mostrados na Figura 25. O anticorpo anti-PTK7 conjugado com toxina atrasou a progressão do crescimento do tumor. Assim, o tratamento com um conjugado anticorpo anti-PTK7-toxina tem um efeito inibidor *in vivo* directo no crescimento tumoral do cancro da mama.

SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
1	a.a. de VH de 3G8, 3G8a	23	a.a. de CDR1 de VK de 3G8
2	a.a. de VH de 4D5	24	a.a. de CDR1 de VK de 3G8a
3	a.a. de VH de 12C6, 12C6a	25	a.a. de CDR1 de VK de 4D5
4	a.a. de VH de 7C8	26	a.a. de CDR1 de VK de 12C6
		27	a.a. de CDR1 de VK de 12C6a
5	a.a. de VK de 3G8	28	a.a. de CDR1 de VK de 7C8
6	a.a. de VK de 3G8a		
7	a.a. de VK de 4D5	29	a.a. de CDR2 de VK de 3G8
8	a.a. de VK de 12C6	30	a.a. de CDR2 de VK de 3G8a
9	a.a. de VK de 12C6a	31	a.a. de CDR2 de VK de 4D5
10	a.a. de VK de 7C8	32	a.a. de CDR2 de VK de 12C6
		33	a.a. de CDR2 de VK de 12C6a
11	a.a. de CDR1 de VH de 3G8	34	a.a. de CDR2 de VK de 7C8
12	a.a. de CDR1 de VH de 4D5		
13	a.a. de CDR1 de VH de 12C6	35	a.a. de CDR3 de VK de 3G8
14	a.a. de CDR1 de VH de 7C8	36	a.a. de CDR3 de VK de 3G8a
		37	a.a. de CDR3 de VK de 4D5
15	a.a. de CDR2 de VH de 3G8	38	a.a. de CDR3 de VK de 12C6
16	a.a. de CDR2 de VH de 4D5	39	a.a. de CDR3 de VK de 12C6a
17	a.a. de CDR2 de VH de 12C6	40	a.a. de CDR3 de VK de 7C8

18	a.a. de CDR2 de VH de 7C8		
		41	n.t. de VH de 3G8, 3G8a
19	a.a. de CDR3 de VH de 3G8	42	n.t. de VH de 4D5
20	a.a. de CDR3 de VH de 4D5	43	n.t. de VH de 12C6, 12C6a
21	a.a. de CDR3 de VH de 12C6	44	n.t. de VH de 7C8
22	a.a. de CDR3 de VH de 7C8		
45	n.t. de VK de 3G8	51	a.a. da linha germinativa VH3-30.3
46	n.t. de VK de 3G8a	52	a.a. da linha germinativa VHDP44
47	n.t. de VK de 4D5	53	a.a. da linha germinativa VH3-33
48	n.t. de VK de 12C6		
49	n.t. de VK de 12C6a	54	a.a. da linha germinativa VKL15
50	n.t. de VK de 7C8	55	a.a. da linha germinativa VKA10
		56	a.a. da linha germinativa VKA27
		57	a.a. da linha germinativa VKL6
		58	a.a. da PTK7
		59	a.a. da linha germinativa JH4b
		60	a.a. da linha germinativa JH4b
		61	a.a. da linha germinativa 3-7
		62	a.a. da linha germinativa 3-23
		63	a.a. da linha germinativa JH4b
		64	a.a. da linha germinativa JH6b
		65	a.a. da linha germinativa JK1
		66	a.a. da linha germinativa JK5
		67	a.a. da linha germinativa JK2
		68	a.a. da linha germinativa JK2
		69	a.a. da linha germinativa JK3

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> MEDAREX, INC.

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA A PROTEÍNA
 TIROSINA-CINASE 7 (PTK7) E MÉTODOS PARA UTILIZAÇÃO DE
 ANTICORPOS ANTI-PTK7

<130> MXI-345PC

<140>

<141>

<150> 60/748,373

<151> 2005-12-08

<160> 69

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100           105           110
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Leu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly
          100          105          110
Thr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
          85           90           95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

Asn Tyr Ala Met His
 1           5

```

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

Ser Tyr Ala Phe His
 1           5

```

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

Thr Tyr Leu Met Tyr
 1           5

```

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Ala	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
1				5					10					15	

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Val	Ile	Trp	Asp	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Glu	Val	Trp	Ser	Ile	Asp	Asn
1				5		

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Gly	Leu	Gly	Tyr
1			

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Asp	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	Phe	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Asp
1				5					10					15	

Val

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 24

<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile Thr
1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

<210> 41

<211> 348

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (348)

<400> 41

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg cga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc atc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt ata tca tat gat gga aac aat aaa tac tac gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gag gtc tgg agt att gac aac tgg ggc cag gga acc ctg gtc	336
Ala Arg Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
acc gtc tcc tca	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 42

<211> 345

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 42

```

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

gct ttc cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

gca gtt ata tca tat gat gga agc att aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gcg agg acg tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc 336
Ala Arg Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          100          105          110

gtc tcc tca 345
Val Ser Ser
          115

```

<210> 43

<211> 336

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 43

```

gag gtt cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cat cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga ttc acc ttc agt acc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

ctt atg tac tgg gtt cgc cag gct cca gga aaa act ctg gag tgg gtc 144
Leu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gct att ggt tct ggt ggt gat aca tac tat gca gac tcc gtg aag 192
Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt 240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac atg gct gtg tat tac tgt gca 288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

aga gga ctg ggc tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 336
Arg Gly Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

```

<210> 44

<211> 378

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (378)

<400> 44

```

cag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tgg gat gat gga agt aat aaa tac tat gta gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gat gat tac tat ggt tgg ggg agt ttt aac tcc tac tac ggt 336
Ala Arg Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly
100 105 110

acg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 378
Thr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```

<210> 45
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 45
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 46
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

```

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                55                60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                70                75                80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
                85                90                95

act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
        100                105

```

<210> 47

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

<400> 47

```

gaa att gtg ctg act cag tct cca gac ttt cag tct gtg act cca aag 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
    1                5                10                15

gag aaa gtc acc atc acc tgc cgg gcc agt cag agc att ggt agt agc 96
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
                20                25                30

tta cac tgg tac cag cag aaa cca gat cag tct cca aag ctc ctc atc 144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45

aag tat gct tcc cag tcc ttc tca ggg gtc ccc tcg agg ttc agt ggc 192
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                55                60

agt gga tct ggg aca gat ttc acc ctc acc atc aat agc ctg gaa gct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
    65                70                75                80

gaa gat gct gca gcg tat tac tgt cat cag agt agt agt tta ccg atc 288
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile
                85                90                95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
        100                105

```

<210> 48

<211> 327

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 48

```

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccc 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

atg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 327
Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

<210> 49

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321).

<400> 49

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

<210> 50
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 50
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc atc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct cca 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 ttc act ttc gcc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 324
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 52
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 53
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 54
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
          85           90           95

```

<210> 55

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro
          85           90           95

```

<210> 56

<211> 96

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95

```

<210> 57

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
          85           90           95

```

<210> 58

<211> 1070

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

```

Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu
 1           5           10           15
Leu Ser Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Gly Thr Gln Thr Ala Ile
          20           25           30
Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg
          35           40           45
Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr
          50           55           60
Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala
          65           70           75           80
Gln Gly Ser Ser Leu Ser Phe Ala Ala Val Asp Arg Leu Gln Asp Ser
          85           90           95
Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala
          100           105           110
Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro
          115           120           125
Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr
          130           135           140

```

Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr
 145 150 155 160
 Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His
 165 170 175
 Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro
 180 185 190
 Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln
 195 200 205
 Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe
 210 215 220
 Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro
 260 265 270
 Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu
 275 280 285
 Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln
 290 295 300
 Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala
 305 310 315 320
 Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly
 325 330 335
 Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro
 340 345 350
 Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg
 355 360 365
 Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser
 370 375 380
 Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg
 385 390 395 400
 Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys
 405 410 415
 Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp
 420 425 430
 Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn
 435 440 445

Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly
 450 455 460
 Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg
 465 470 475 480
 Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val
 485 490 495
 Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln
 500 505 510
 Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly
 515 520 525
 Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu
 530 535 540
 Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val
 545 550 555 560
 Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro
 565 570 575
 Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile
 580 585 590
 Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr
 595 600 605
 Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln
 610 615 620
 Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg
 625 630 635 640
 Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro
 645 650 655
 Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile
 660 665 670
 Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu
 675 680 685
 Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr
 690 695 700
 Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu
 705 710 715 720
 Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln
 725 730 735
 Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly
 740 745 750

Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala
 755 760 765
 Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser
 770 775 780
 Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr
 785 790 795 800
 Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln
 805 810 815
 Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu
 820 825 830
 Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu
 835 840 845
 Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu
 850 855 860
 Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu
 865 870 875 880
 Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys
 885 890 895
 Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr
 900 905 910
 Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His
 915 920 925
 Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val
 930 935 940
 Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr
 945 950 955 960
 Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu
 965 970 975
 Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe
 980 985 990
 Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly
 995 1000 1005
 Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys Ala
 1010 1015 1020
 Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg Leu Met
 1025 1030 1035 1040
 Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser Phe Ser Glu
 1045 1050 1055
 Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser Lys Pro
 1060 1065 1070

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10				15	

<210> 61

<211> 97

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala
			35				40					45			
Asn	Ala	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys
		50				55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu
					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg

<210> 62

<211> 97

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
		50				55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Lys

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10		

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
1				5					10				15		

Ser Ser

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10	

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5					10		

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5					10		

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5					10		

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys
1				5					10		

Lisboa, 2013-06-17

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno deste, em que o anticorpo:

(a) se liga especificamente a PTK7 humana; e

(b) se liga a uma linha celular de tumor de Wilms possuindo o No. de Ac. ATCC CRL-1441 com uma CE_{50} de 4,0 nM ou menos, num ensaio que compreende a incubação de 1×10^5 células com o anticorpo a uma concentração inicial de 30 µg/ml e diluição em série do anticorpo a uma diluição de 1:10; e

(c) se liga ao mesmo epitopo na PTK7 humana que um anticorpo de referência compreendendo:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; ou

(ii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; ou

(iii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

2. Anticorpo da reivindicação 1 que é:

(a) um anticorpo inteiro de um isotipo IgG1 ou IgG4; ou

(b) um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

3. Anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, da reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo se liga a células de tumor de Wilms com uma CE_{50} de 3,5 nM ou menos.

4. Anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, que compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 12, uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 16, uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 20, uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 25, uma

região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 31 e uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 37; ou

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 14, uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 18, uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 22, uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 28, uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 34 e uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 40; ou

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 13, uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 17, uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 21, uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 26, uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 32 e uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 38.

5. Anticorpo, ou porção de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; ou

(b) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; ou

(c) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

6. Imunoconjugado compreendendo o anticorpo, ou a porção de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo radioactivo.

7. Composição compreendendo o anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das

reivindicações 1 a 5 ou o imunoconjugado da reivindicação 6 e um transportador farmacêuticamente aceitável.

8. Molécula de ácido nucleico isolada codificando o anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

9. Vector de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico da reivindicação 8.

10. Célula hospedeira compreendendo o vector de expressão da reivindicação 9.

11. Método *in vitro* para preparação de um anticorpo anti-PTK7 que compreende a expressão do anticorpo na célula hospedeira da reivindicação 10 e isolamento do anticorpo a partir da célula hospedeira.

12. Anticorpo ou porção de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para utilização num método de tratamento ou prevenção de cancro caracterizado pelo crescimento de células tumorais expressando PTK7.

13. Anticorpo, ou porção de ligação ao antigénio deste, da reivindicação 12, em que o cancro é seleccionado a partir de cancro do cólon, cancro do pulmão, cancro da mama, cancro do pâncreas, melanoma, leucemia mieloide aguda, cancro do rim, cancro da bexiga, cancro do ovário e cancro da próstata.

Lisboa, 2013-06-17

VH de anti-PTK7 3G8
 segmento V : 3-30.3
 segmento D : indeterminado
 segmento J : JH4b

```

      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

      ~~~~~ CDR1 ~~~~~
      R L S C A A S G F I F S N Y A M H W
55   CGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ATC TTC AGT AAC TAT GCT ATG CAC TGG

      ~~~~~ CDR2 ~~~~~
      V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

      ~~~~~ CDR2 ~~~~~
      G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163  GGA AAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      ~~~~~ CDR3 ~~~~~
      D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

      ~~~~~ CDR3 ~~~~~
      T A V Y Y C A R E V W S I D N W G Q
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GTC TGG AGT ATT GAC AAC TGG GGC CAG

      ~~~~~ CDR3 ~~~~~
      G T L L V T V S S
325  GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 1A

VK de anti-PTK7 3G8

segmento V : L15

segmento J : JK1

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC AGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

271 Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

Fig. 1B

VK de anti-PTK7 3G8a

segmento V: L15

segmento J: JK3

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

271 Y N S Y P F T F G P G T K V D I K
 TAT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

Fig. 1C

VH de anti-PTK7 4D5
 segmento V: 3-30.3
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH4b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTG CTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

55  R L S C A A S G G F T F S S Y A F H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT TTC CAC TGG

109 V R Q A P G G K G L E W V A V I S Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

163 G S I K Y Y A D S V K G R F T I S R
    GGA AGC ATT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

271 T A V Y Y C A R T Y Y F D Y W G Q G
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG ACG TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA

325 T L V T V S S
    ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

CDR1

CDR2

CDR3

Fig. 2A

VK de anti-PTK7 4D5
 segmento V: A10
 segmento J: JK5

1 E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K
 GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AAA

CDR1
 ~~~~~  
 V T I T C R A S Q S I G S S L H W Y  
 55 GTC ACC ATC ACC TGC CGG GCC AGT CAG AGC ATT GGT AGT AGC TTA CAC TGG TAC

CDR2  
 ~~~~~  
 Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S
 109 CAG CAG AAA CCA GAT CAG TCT CCA AAG CTC CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC

CDR2
 ~~~~~  
 F S G V P S R F S G S G S G T D F T  
 163 TTC TCA GGG GTC CCC TCG AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC

CDR3  
 ~~~~~  
 L T I N S L E A E D A A A Y Y C H Q
 217 CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GCT GAA GAT GCT GCA GCG TAT TAC TGT CAT CAG

CDR3
 ~~~~~  
 S S S L P I T F G Q G T R L E I K  
 271 AGT AGT AGT TTA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

Fig. 2B

VH de anti-PTK7 12C6  
 segmento V: DP-44  
 segmento D: indeterminado  
 segmento J: JH4b

```

1   E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L
    GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGC GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55 R L S C A G S G F T F S T Y L M Y W
 AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT CTT ATG TAC TGG

 CDR2
                                ~~~~~
109 V R Q A P G K T L E W V S A I G S G
    GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA ACT CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT GGT TCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163 G D T Y Y A D S V K G R F T I S R D
 GGT GAT ACA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

 CDR2
                                ~~~~~
217 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M
    AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ATG

                                CDR3
                                ~~~~~
271 A V Y Y C A R G L G Y W G Q G T L V
 GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGA CTG GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC

 CDR3
                                ~~~~~
325 T V S S
    ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 3A

VK de anti-PTK7 12C6  
segmento V: A27  
segmento J: JK2

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                                CDR3
      R A T G I P D R F S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGC ACA GAC TTC

                                CDR3
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
      Q Y G S S P M Y T F G Q Q G T K L E I
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ATG TAC ACT TTT GGC CAG GGC ACC AAG CTG GAG ATC

      K
325 AAA

```

Fig. 3B

VK de anti-PTK7 12C6

segmento V: L15

segmento J: JK2

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

## CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y  
 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

## CDR2

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L  
 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

## CDR2

163 Q S G V P S R F S G S G T D F T  
 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

## CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

## CDR3

271 Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K  
 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

Fig. 3C

VH de anti-PTK7 7C8  
 segmento V: 3-33  
 segmento D: 3-10  
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55 R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

 CDR2
                                ~~~~~
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W D D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163 G S N K Y Y V D S V K G R F T I S R
 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

 CDR2
                                ~~~~~
217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271 T A V Y Y C A R D D Y Y G S G S F N
 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TTT AAC

 CDR3
                                ~~~~~
325 S Y Y G T D V W G Q G T V T V S S
    TCC TAC TAC GGT ACG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Fig. 4A

VK de anti-PTK7 7C8

segmento V : L6

segmento J : JK3

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R  
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

## CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S I Y L A W Y  
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC ATC TAC TTA GCC TGG TAC

## CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R  
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

## CDR2

163 A T G I P A R F S G S G T D F T  
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG ACA GAC TTC ACT

## CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q  
 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

## CDR3

271 R S N W P P F T F G P G T K V D I K  
 CGT AGC AAC TGG CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

Fig. 4B

## Região VH de anti-PTK7 3G8 e 3G8a

|                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. 3-30.3 | Q | V | Q | L | V | E | S | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A | A | S | G | F | T | F | S | S | Y | A | M | H | W |
| VH de 3G8          | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VH de 3G8a         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |

|                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. 3-30.3 | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | V | I | S | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T | I | S | R |
| VH de 3G8          | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VH de 3G8a         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |

|                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. 3-30.3 | D | N | S | K | N | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | C | A | R |
| linha germ. JH4b   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VH de 3G8          | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| VH de 3G8a         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |

|                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. JH4b | G | T | L | V | T | V | S | S |
| VH de 3G8        | - | - | - | - | - | - | - | - |
| VH de 3G8a       | - | - | - | - | - | - | - | - |

(JH4b)  
(JH4b)

Fig. 5

## Região VH de anti-PTK7 4D5

linha germ. 3-30.3 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R  
 VH de 4D5 - - - - - F - - - - - CDR1

linha germ. 3-30.3 Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K  
 VH de 4D5 - - - - - I - - - - - CDR2

linha germ. 3-30.3 N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y C A R - - - - - CDR3  
 linha germ. JH4b Y F D Y W G Q G T L V T V S  
 VH de 4D5 - - - - - T Y - - - - -

linha germ. JH4b S  
 VH de 4D5 - (JH4b)

Fig. 6



## Região VH de anti-PTK7 7C8

|             |             |                                                         |             |             |
|-------------|-------------|---------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| linha germ. | <b>3-33</b> | Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A S G F T F S | <u>CDRI</u> | S Y G M H W |
| VH de 7C8   | - - - - -   | - - - - -                                               | - - - - -   | - - - - -   |

linha germ. 3-33      V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R  
VH de 7C8            - - - - - - - - - - D - - - - - V - - - - -

CDR2

[illegible]

|                  |                      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. 3-33 | <u>Y Y Y G M D V</u> | W | G | Q | G | T | T | V | T | V | S | S |
| VH de 7C8        | S                    | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - |

(JH6b)

**Fig. 8**

Regiões VK de anti-PTK7 3G8 e 3G8a

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. L15 | D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C | R | A | S | Q | G | I | S |
| VK de 3G8       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VK de 3G8a      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. L15 | W | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | E | K | A | P | K | S | L | I | Y | A | A | S | S | L | Q | S | G | V | P | S | R | F |
| VK de 3G8       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VK de 3G8a      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| linha germ. L15 | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q | Q | Y | N | S |
| VK de 3G8       | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| VK de 3G8a      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| linha germ. L15 | Y | P |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| linha germ. JK1 |   |   | T | F | G | Q | G | T | K | V | E | I | K |       |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| VK de 3G8       | - | - | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (JK1) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| VK de 3G8a      | - | - | F | - | - | P | - | - | - | - | - | D | - | (JK3) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Fig. 9



## Região VK de anti-PTK7 12C6

|                 |                                                                         |                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| linha germ. A27 | E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W   | CDR1                    |
| VK1 de 12C6     | - - - - -                                                               | - - - - -               |
| linha germ. A27 | Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F | CDR2                    |
| VK1 de 12C6     | - - - - -                                                               | - - - - -               |
| linha germ. A27 | T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P                         | CDR3                    |
| linha germ. JK2 | - - - - -                                                               | Y T F G Q G T K L E I K |
| VK1 de 12C6     | - - - - -                                                               | - M - - - - - (JK2)     |

Fig. 11

## Região VK de anti-PTK7 12C6

|                 |                                                               |           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| linha germ. L15 | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S | CDR1      |
| VK2 de 12C6     | - - - - -                                                     | - - - - - |

|                 |                                                               |           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| linha germ. L15 | W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F | CDR2      |
| VK2 de 12C6     | - - - - -                                                     | - - - - - |

|                 |                                                             |           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| linha germ. L15 | S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Y N S | CDR3      |
| VK2 de 12C6     | - - - - -                                                   | - - - - - |

|                 |                         |           |
|-----------------|-------------------------|-----------|
| linha germ. L15 | Y P                     |           |
| linha germ. JK2 | Y T F G Q G T K L E I K | (JK2)     |
| VK2 de 12C6     | - - - - -               | - - - - - |

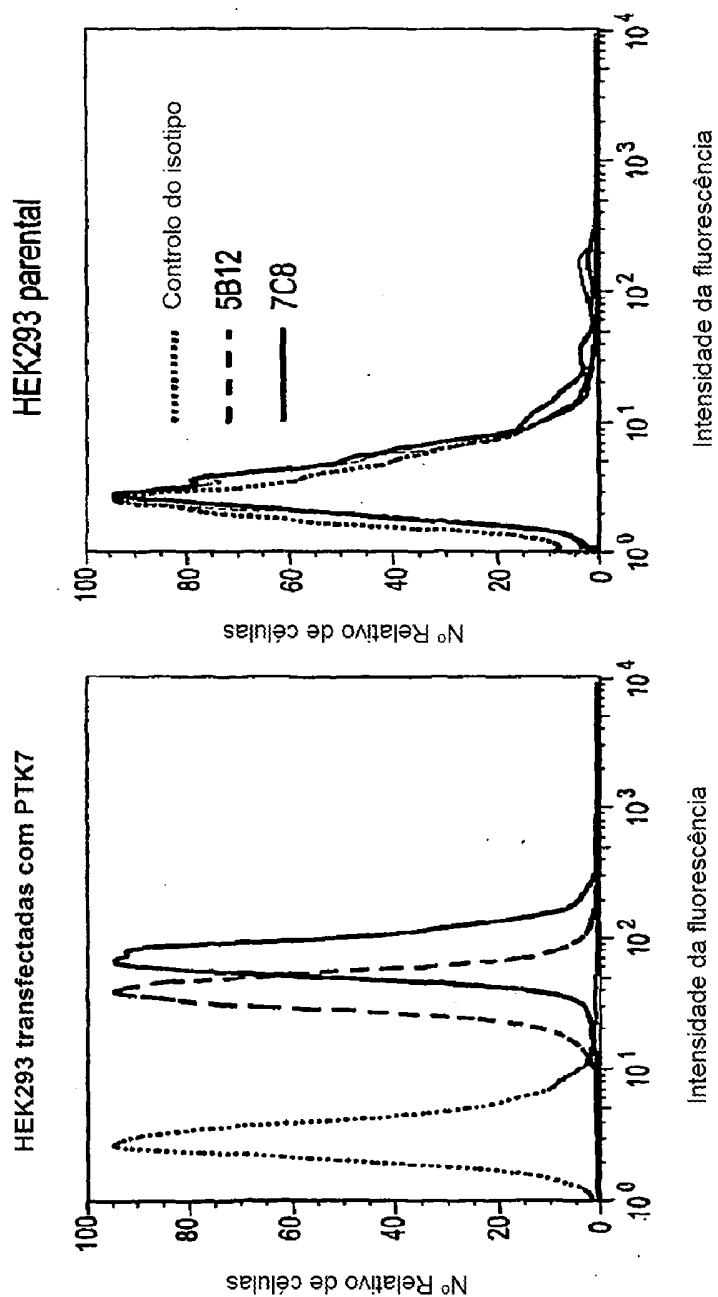
Fig. 12

## Região VK de anti-PTK7 7C8

|                 |                                                                         |                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| linha germ. L6  | E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y | CDR1                    |
| VK1 de 7C8      | - - - - -                                                               | - - - - - I - - - - -   |
| linha germ. L6  | Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T | CDR2                    |
| VK1 de 7C8      | - - - - -                                                               | - - - - -               |
| linha germ. L6  | L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W P P                           | CDR3                    |
| linha germ. JK3 | - - - - -                                                               | F T F G P G T K V D I K |
| VK1 de 7C8      | - - - - -                                                               | - - - - - (JK3)         |

Fig. 13

**Ligação de HuMab anti-PTK7 a células Transfectadas  
com PTK7**



**Fig. 14**

Ligação de anticorpos de PTK7 à proteína PTK7 através de ELISA

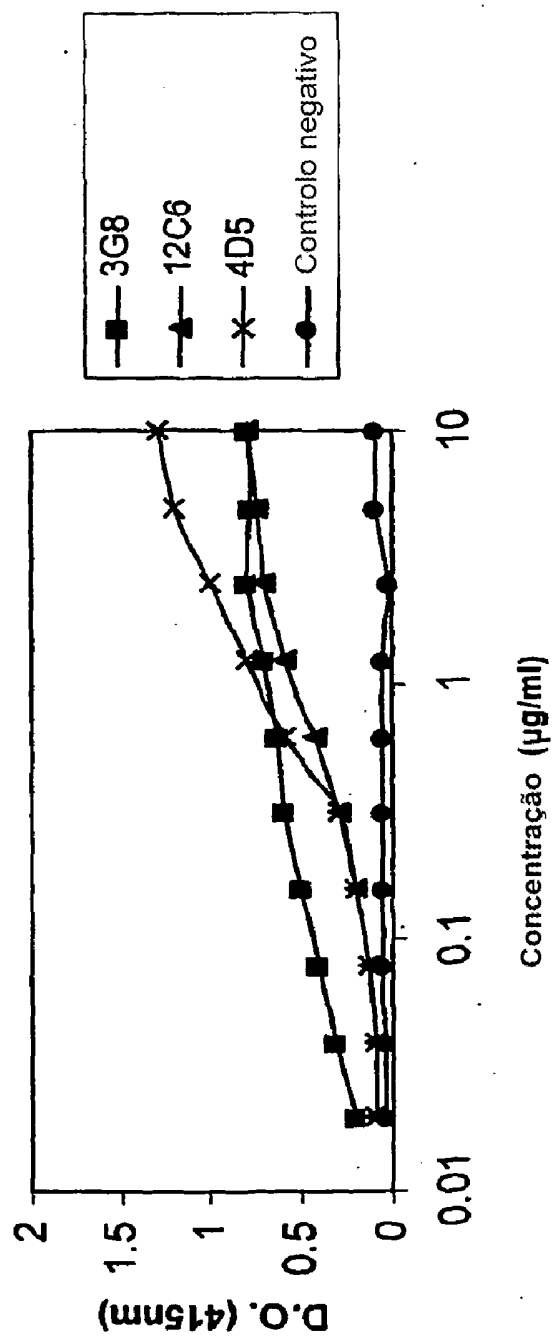


Fig. 15

Titulação por FACS em células de tumor de Wilms

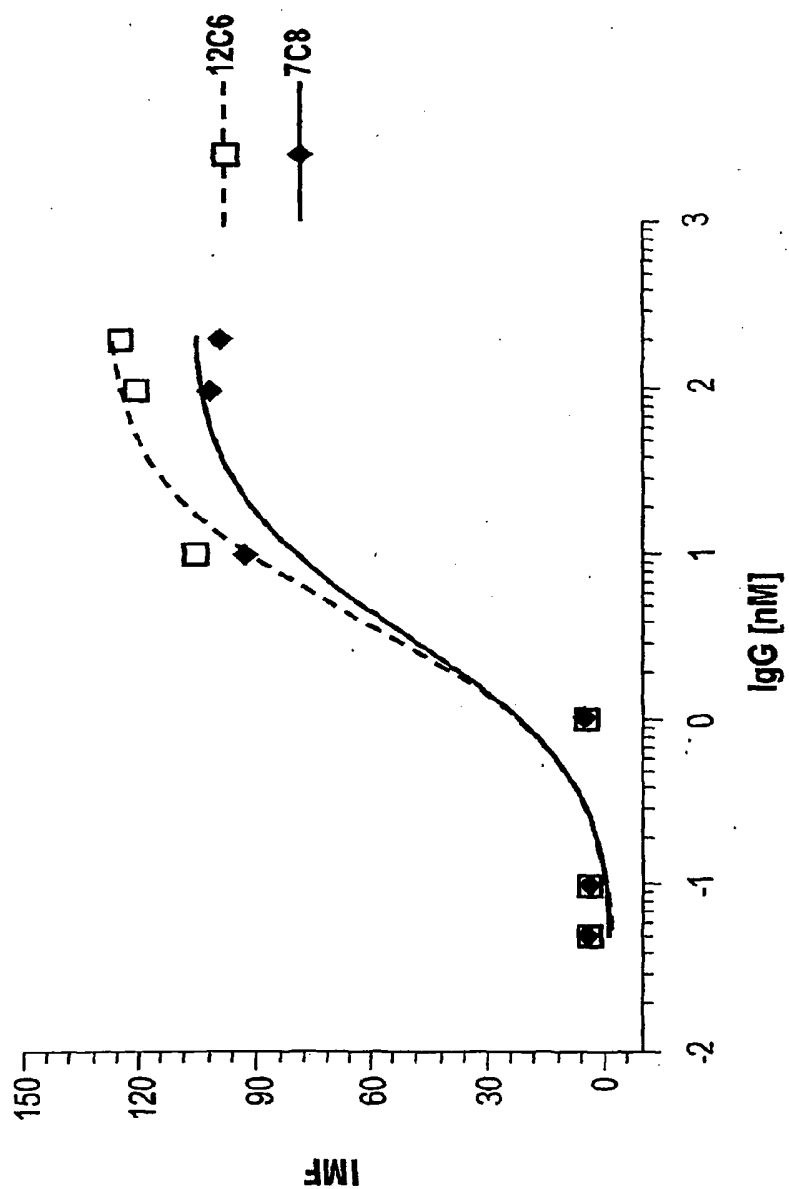


Fig. 16

Expressão de PTK7 em linhas celulares tumorais endógenas através de FACS

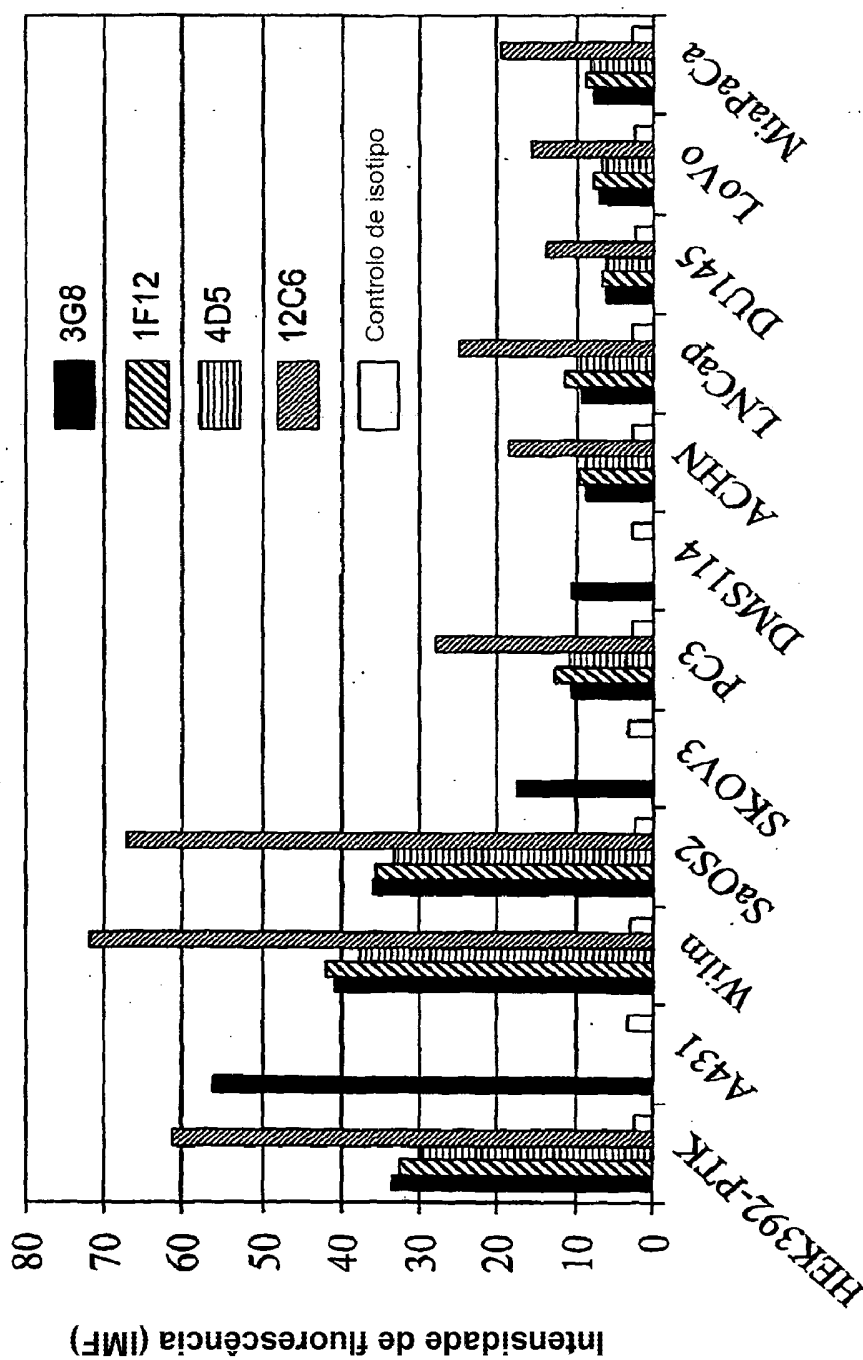


Fig. 17

## Análise FACS de linfócitos humanos activados para PTK7

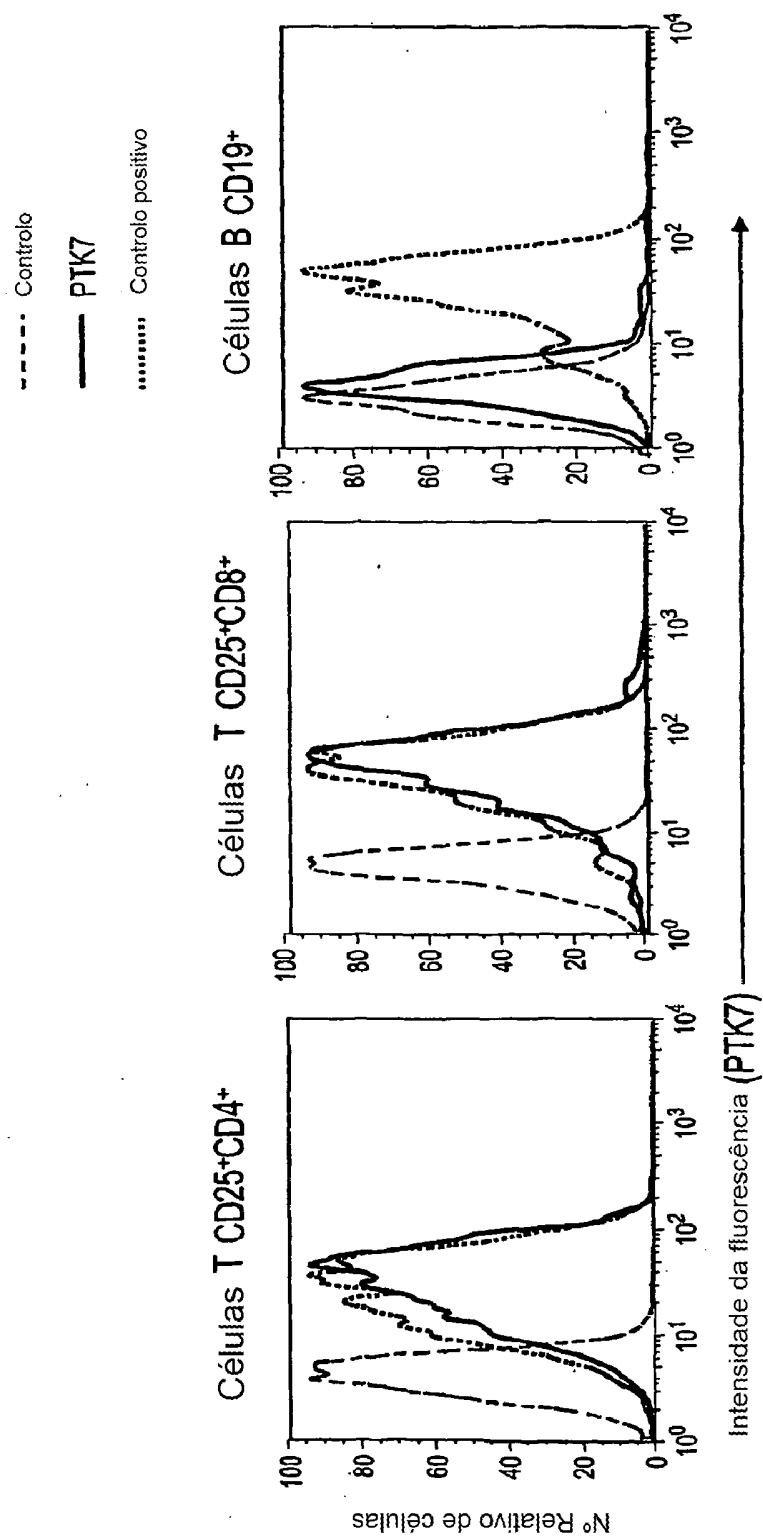
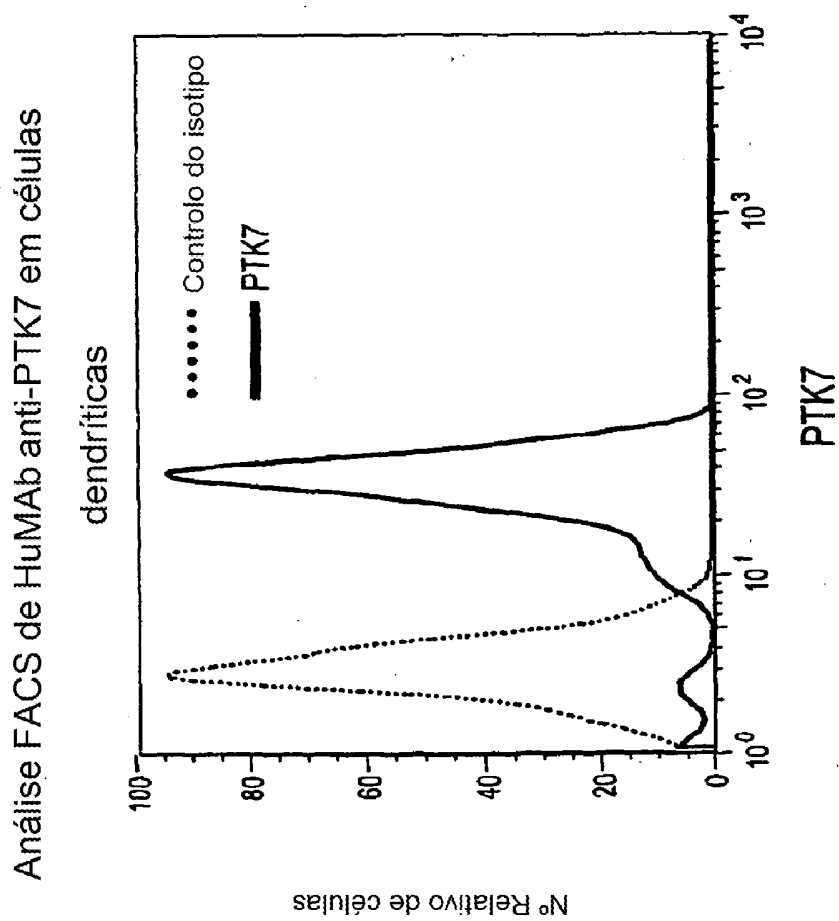
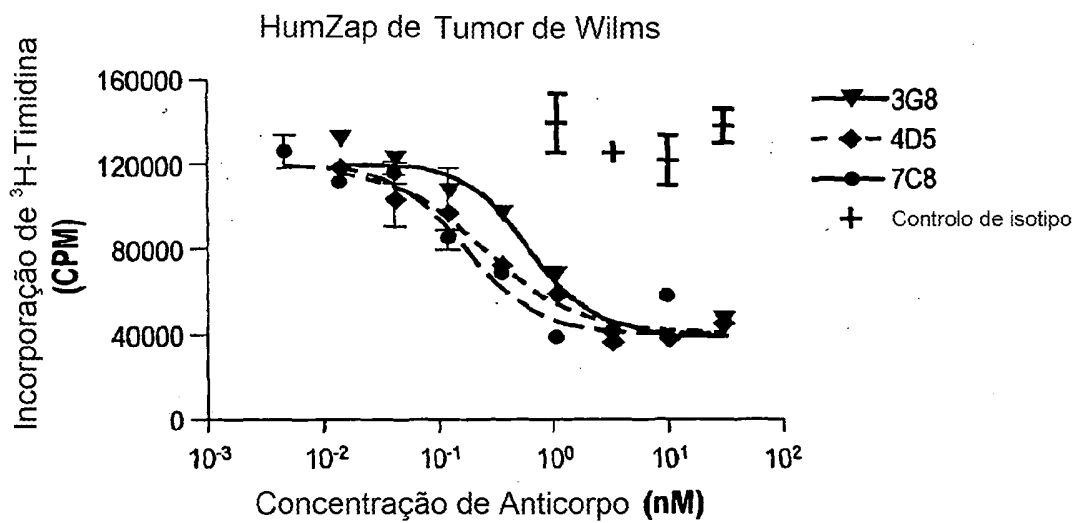
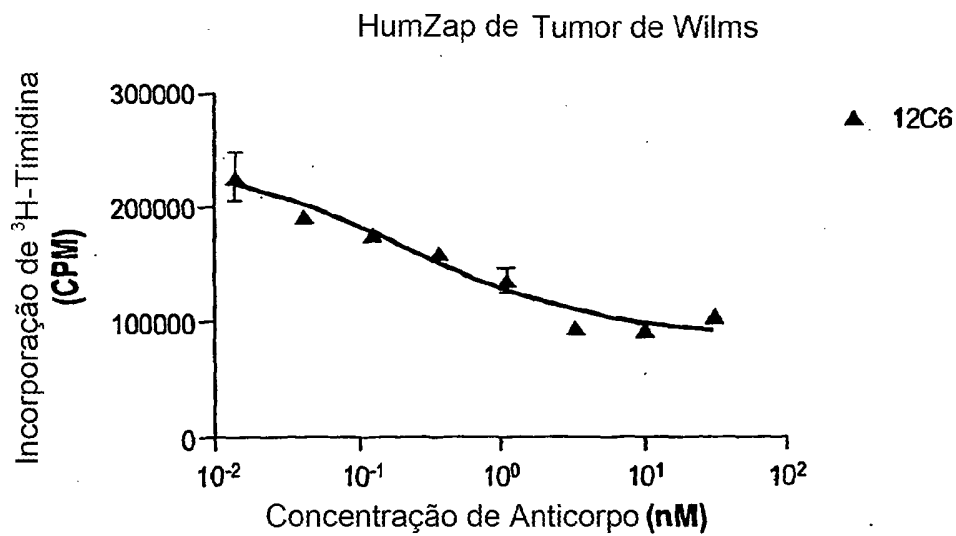
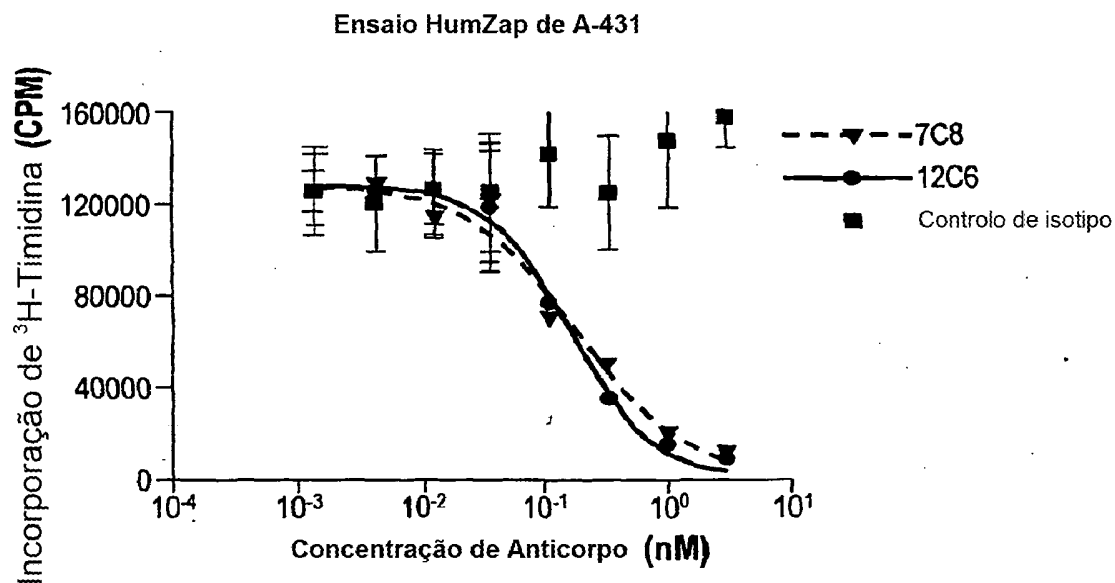
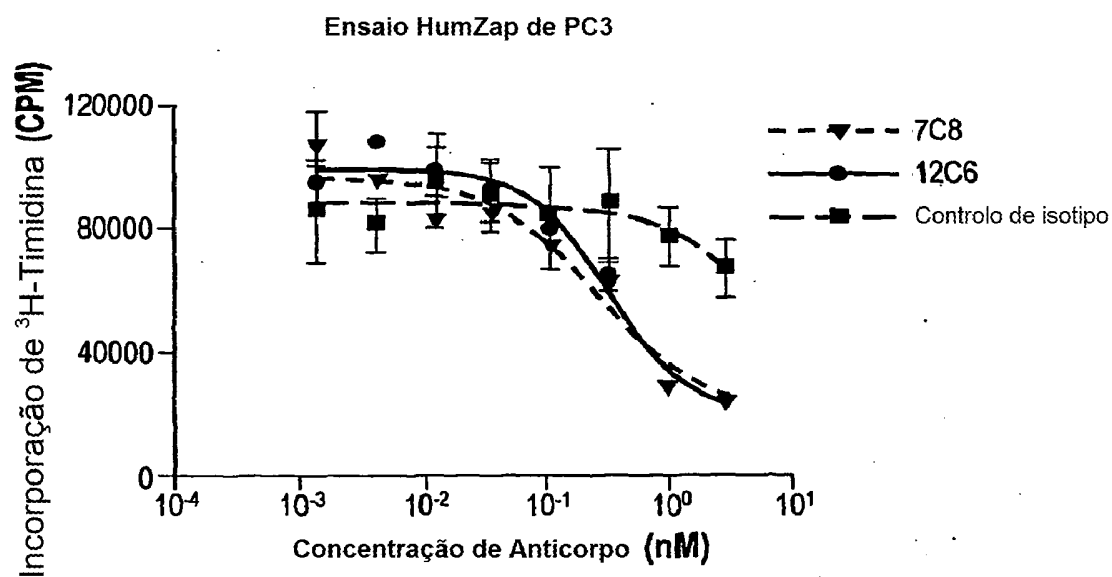


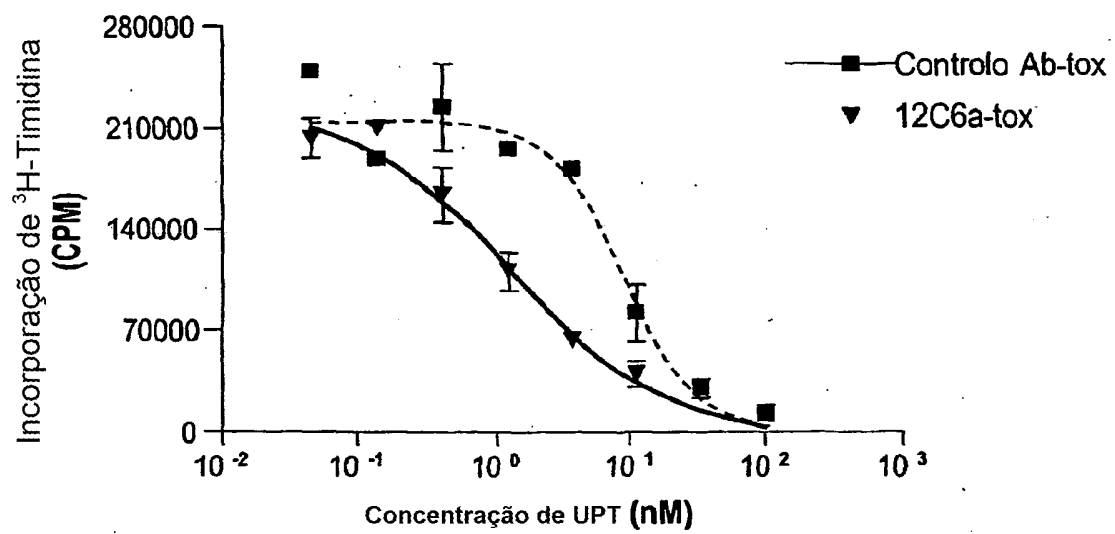
Fig. 18

**Fig. 19**

**Fig. 20A****Fig. 20B**

**Fig. 20C****Fig. 20D**

### Proliferação de Wilm 72h - Sem lavagem



**Fig. 21**

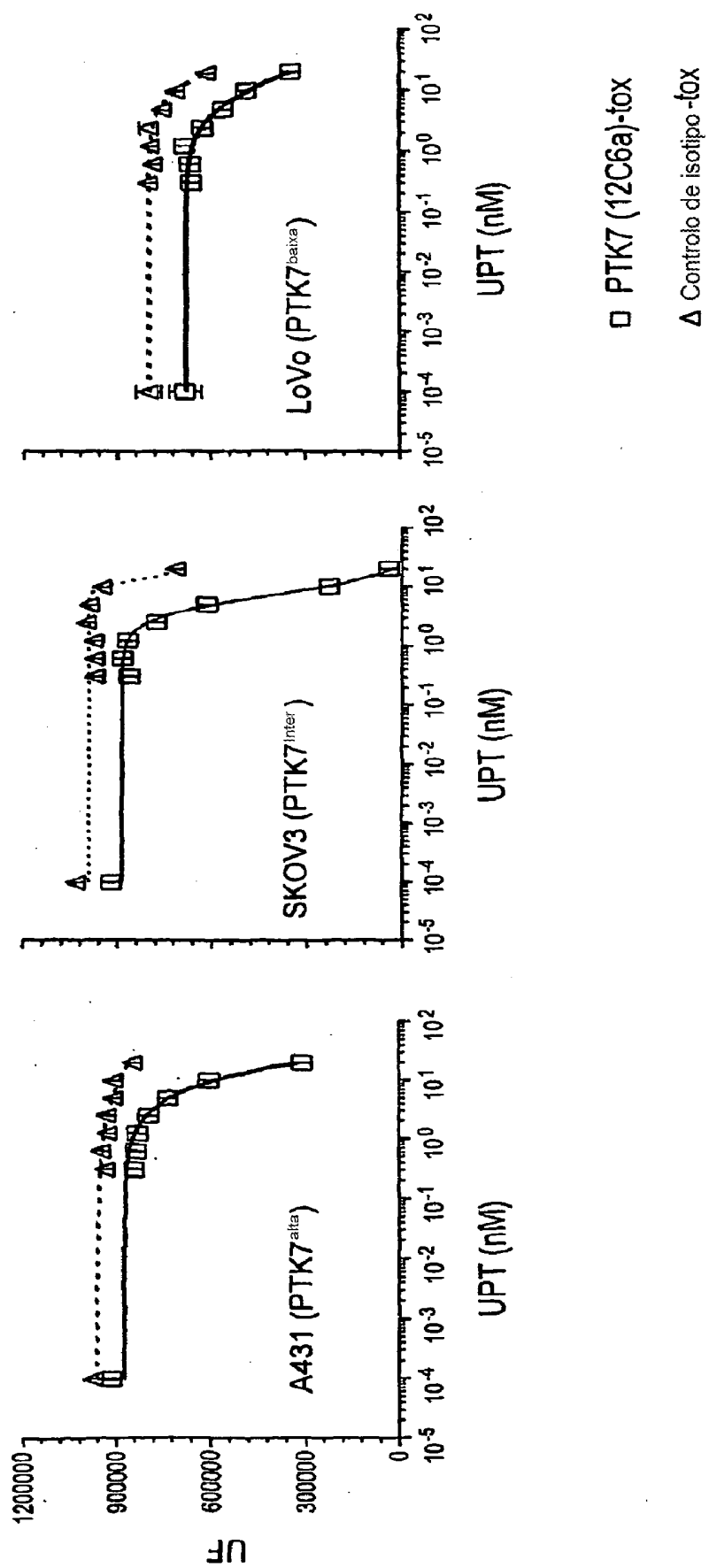
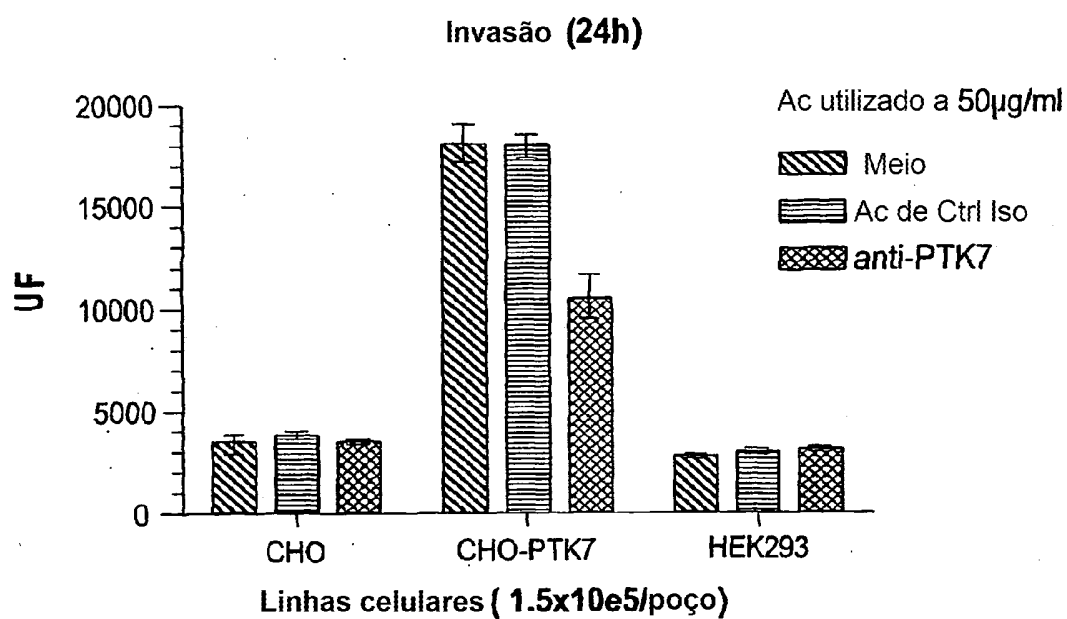


Fig. 22

**Fig. 23**

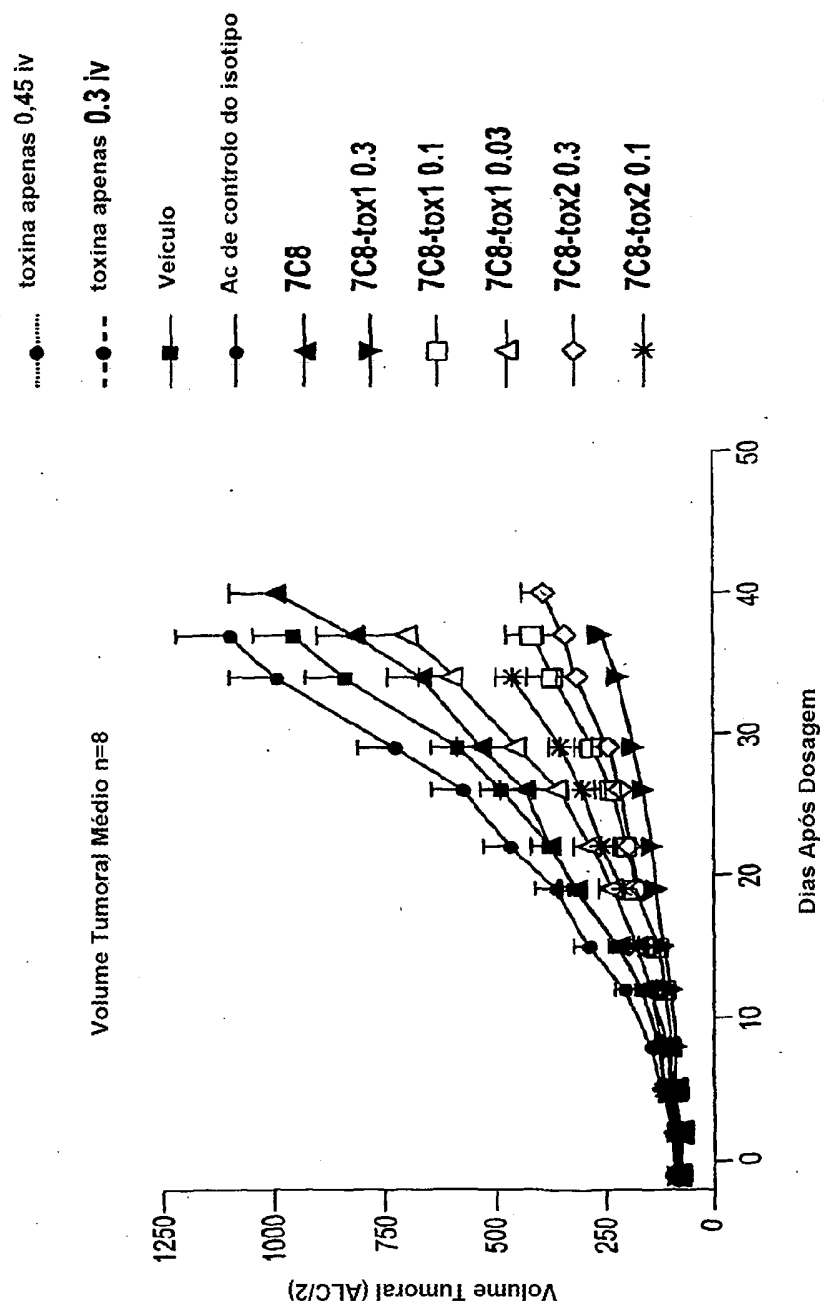
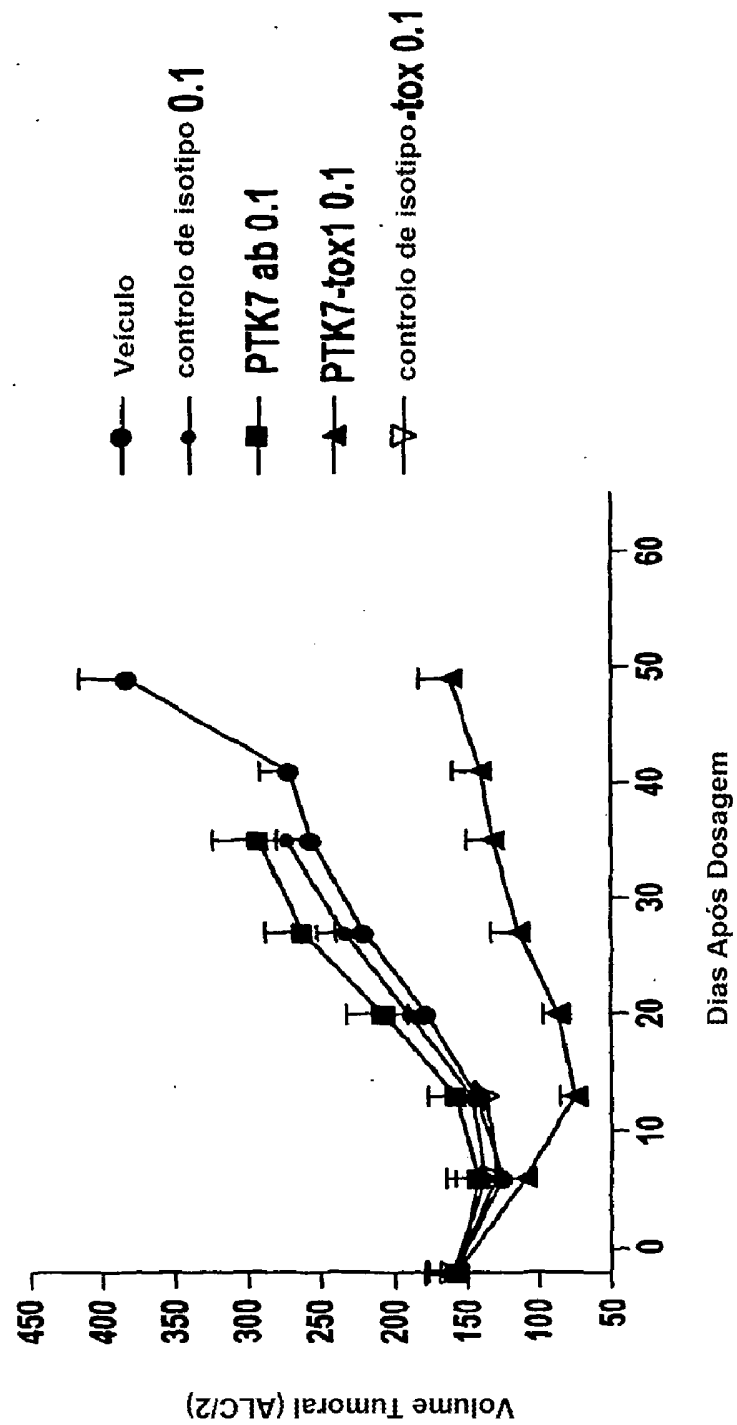


Fig. 24

**1372-009 MCF7/Adr**

Volume Tumoral Médio n=9

**Fig. 25**