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

(21) BR 112019015950-9 A2

BR112019015950A2

(22) Data do Depósito: 01/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(54) Título: CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-CCR7 E FÁRMACO

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 47/68; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 03/02/2017 US 62/454,476.

(71) Depositante(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): STEVEN BENDER; TRACY CHARLTON; ANNA GALKIN; BERNHARD HUBERT GEIERSTANGER; SCOTT MARTIN GLASER; SHAILAJA KASIBHATLA; MARK KNUTH; SABINE ROTTMANN; SARAH RUE; GLEN SPRAGGON; TETSUO UNO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018050639 de 01/02/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/142322 de 09/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 01/08/2019

(57) Resumo: Este pedido divulga anticorpos anti-CCR7, seus fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco dos referidos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno. A invenção também se relaciona com métodos de tratamento ou prevenção de câncer utilizando os anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco. Também são aqui divulgados métodos de produzir os anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco, e métodos de usar os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno como reagentes de diagnóstico.

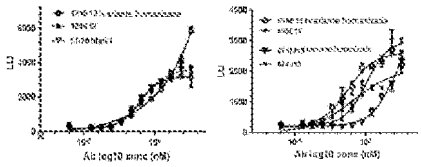


Figura 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-CCR7 E FÁRMACO".**

Referência Cruzada a Pedido Relacionado

[0001] Este pedido reivindica o benefício ao Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 62/454.476, depositado a 3 de fevereiro de 2017, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

Listagem De Sequências

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada a 10 de janeiro de 2018, é nomeada PAT057594-WO-PCT_SL.txt e tem 387.054 bytes de tamanho.

Campo da Invenção

[0003] A presente invenção se relaciona genericamente com anticorpos anti-CCR7, fragmentos de anticorpo e seus imunoconjugados e os seus usos para o tratamento ou prevenção do câncer.

Antecedentes da Invenção

[0004] O receptor de quimiocina CC 7 (CCR7) foi identificado pela primeira vez em 1993 como um receptor específico de linfócitos (ver, por exemplo, Birkenbach *et al.*, J Virol. abril de 1993;67(4):2209-20). A sua expressão é restrita a subconjuntos de células imunes, tais como células T não manipuladas, células T de memória central (Tcm), células T reguladoras (Treg), células B não manipuladas, células NK, e células dendríticas maduras apresentadoras de antígenos (DC). CCR7 regula o endereçamento de células imunes para e dentro de órgãos linfoides e desempenha assim um papel fundamental no equilíbrio da imunidade e tolerância (ver, por exemplo, Förster *et al.*, Nat Rev Immunol. maio de 2008;8(5):362-71).

[0005] CCR7 é um receptor de classe A, acoplado à proteína G tipo rodopsina (GPCR), com dois ligantes, CCL21 e CCL19. A estrutu-

ra CCR7 ainda não foi totalmente resolvida, contudo, certos motivos foram determinados como essenciais para a atividade do receptor (ver, por exemplo, Legler *et al.*, Int J Biochem Cell Biol. 1 de julho de 2014).

CCR7 e Câncer

[0006] CCR7 (também referido como EBI1, BLR2, CC-CKR-7, CMKBR7, CD197 e CDw197) é também conhecido por estar sobre-expresso em vários tumores malignos, incluindo malignidades de célula B (por exemplo, CLL, MCL, linfoma de Burkitt), malignidades de células T (por exemplo, ATLL), HNSCC, ESCC, carcinoma gástrico, NSCLC, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer da tireoide, câncer da mama e câncer cervical, entre outros. A sobre-expressão de CCR7 em, por exemplo, carcinoma colorretal, ESCC, câncer pancreático, HNSCC e câncer gástrico foi associada a tumor de estágio avançado (ver, por exemplo, Malietzis *et al.*, Journal of Surgical Oncology 2015;112:86–92; Irino *et al.*, BMC Cancer 2014, 14:291; Guo *et al.*, Oncology Letters 5: 1572-1578, 2013; Xia *et al.*, Oral Dis. janeiro de 2015;21(1):123-31; Du et al., Gastric Cancer. 16 de março de 2016).

[0007] Para além disso, foi demonstrado que a expressão de CCR7 em, por exemplo, HNSCC desempenha um papel na resistência à quimioterapia (ver, por exemplo, Wang *et al.*, JNCI J Natl Cancer Inst (2008) 100 (7): 502-512.). Em certos tipos de câncer, tal como câncer pancreático e carcinoma nasofaríngeo (NPC), CCR7 é conhecido por promover a metástase de células tipo tronco cancerígenas e formação de esferas (ver, por exemplo, Zhang *et al.*, PLOS ONE 11 (8); Lun *et al.*, PLOS ONE 7(12)). O papel de CCR7 na migração celular, capacidade de invasão e EMT (transição epitelial-mesenquimal) é descrito em vários tipos de câncer, tal como câncer pancreático e da mama *in vitro* e *in vivo* (ver, por exemplo, Pang *et al.*, Oncogene (2015), 1–13); Sperveslage *et al.*, Int. J. Cancer: 131, E371–E381 (2012)). Vias chave que foram descritas como sendo essenciais para sinalização de CCR7

incluem p38/ERK1/2 mediada por b-Arrestina e sinalização Rho (ver, por exemplo, Noor *et al.*, J Neuroinflammation, 25 de abril de 2012; 9:77).

[0008] Vários processos relacionados com câncer são conhecidos como indutores da expressão de CCR7. Em HNSCC, a expressão de CCR7 é demonstrada como sendo induzida por fatores de transcrição NF-kB e AP1 através de ligação direta a locais no promotor de CCR7 (Mburu *et al.*, J. Biol. Chem. 2012, 287:3581-3590). Em particular, a expressão de CCR7 é regulada por vários fatores no microambiente tumoral. Em este contexto, é conhecido que a expressão de CCR7 é induzida através da via b-Defensina 3/NF-kB em HNSCC (ver, por exemplo, Mburu *et al.*, Carcinogenesis vol.32, nº2, páginas 168 a 174, 2010) e Receptor A de Endotelina e fator-1 induzível por hipoxia em células tumorais da mama (ver, por exemplo, Wilson *et al.*, Cancer Res 2006;66:11802-11807).

Conjugados de Anticorpo e Fármaco

[0009] Conjugados de anticorpo e fármaco ("ADC") têm vindo a ser usados para a administração local de agentes citotóxicos no tratamento do câncer (ver, por exemplo, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005). Os ADC permitem a administração dirigida da porção de fármaco com a qual pode ser alcançada eficácia máxima com toxicidade mínima. Os ADC incluem um anticorpo selecionado pela sua capacidade de se ligar a uma célula direcionada para intervenção terapêutica, ligada a um fármaco selecionado pela sua atividade citostática ou citotóxica. A ligação do anticorpo à célula visada faz assim com que o fármaco chegue ao local onde o seu efeito terapêutico é necessário.

[0010] Muitos anticorpos que reconhecem e se ligam seletivamente a células visadas, por exemplo, células cancerígenas, foram divulgados para uso em ADC. Apesar do extenso trabalho acerca de ADC, a ligação de anticorpos a um alvo particular de interesse não é sufici-

ente para prever o sucesso em aplicações de ADC. Exemplos de fatores que podem ter um efeito sobre a eficácia terapêutica de ADC (para além de propriedades intrínsecas ao alvo) incluem vários aspectos que necessitam de aperfeiçoamento personalizado, tal como a afinidade de anticorpo ótima como um equilíbrio entre disposição mediada pelo alvo (TMDD) e exposição promotora de eficácia, avaliação de funções mediadas por Fc (citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo, ADCC), método de conjugação (específico ao local ou não), a proporção de fármaco/ moléculas de carga útil que se conjugam com cada anticorpo ("DAR" ou "razão entre fármaco e anticorpo"), a clivabilidade ou estabilidade do ligante, estabilidade do ADC e a tendência de um ADC para se agregar.

[0011] Continua a haver necessidade de anticorpos, métodos de ligação e cargas úteis citotóxicas com propriedades melhoradas para uso como composições e métodos terapêuticos eficazes de ADC.

Sumário da invenção

[0012] O presente pedido divulga um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga à proteína CCR7 humana, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem função efetora reduzida ou não significativa em comparação com um anticorpo de tipo selvagem do mesmo isotipo. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem um nível reduzido ou não significativo de atividade de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC). Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma região Fc silenciada. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma mutação na região Fc selecionada a partir de: D265A; P329A; P329G; N297A; D265A e P329A; D265A e N297A; L234 e L235A; P329A, L234A e L235A; e P329G, L234A e L235A. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno não tem atividade significativa

de extermínio de células. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga com maior afinidade a células expressando níveis mais elevados de CCR7 do que células expressando níveis inferiores de CCR7. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga com maior afinidade a células cancerígenas que expressam níveis mais elevados de CCR7 do que a células normais que expressam níveis inferiores de CCR7. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno não elimina significativamente células hematopoiéticas normais que expressam CCR7.

[0013] Em uma modalidade, o presente pedido divulga um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7, compreendendo:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 1) de SEQ ID NO:1, uma HCDR2 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 2) de SEQ ID NO:2 e uma HCDR3 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 3) de SEQ ID NO:3; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 1) de SEQ ID NO:17, uma LCDR2 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 2) de SEQ ID NO:18 e uma LCDR3 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 3) de SEQ ID NO:19;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:4, uma HCDR2 de SEQ ID NO:5 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:6; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:20, uma LCDR2 de SEQ ID NO:21 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:22;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:7, uma HCDR2 de SEQ ID NO:8 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:9; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:23, uma LCDR2 de SEQ ID NO:24 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:25;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:10, uma HCDR2 de SEQ ID NO:11 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:12; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:26, uma LCDR2 de SEQ ID NO:27 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:28;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:33, uma HCDR2 de SEQ ID NO:34 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:35; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:49, uma LCDR2 de SEQ ID NO:50 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:51;

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:36, uma HCDR2 de SEQ ID NO:37 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:38; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:52, uma LCDR2 de SEQ ID NO:53 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:54;

g. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:39, uma HCDR2 de SEQ ID NO:40 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:41; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:55, uma LCDR2 de SEQ ID NO:56 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:57;

h. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:42, uma HCDR2 de SEQ ID NO:43 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:44; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:58, uma LCDR2 de SEQ ID NO:59 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:60;

i. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:65, uma HCDR2 de SEQ ID NO:66 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:67; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:81, uma LCDR2 de SEQ ID NO:82 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:83;

j. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:68, uma HCDR2 de SEQ ID NO:69 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:70; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:84, uma LCDR2 de SEQ ID NO:85 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:86;

k. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:71, uma HCDR2 de SEQ ID NO:72 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:73; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:87, uma LCDR2 de SEQ ID NO:88 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:89;

l. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:74, uma HCDR2 de SEQ ID NO:75 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:76; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:90, uma LCDR2 de SEQ ID NO:91 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:92;

m. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:596, uma HCDR2 de SEQ ID NO:597 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:598; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:612, uma LCDR2 de SEQ ID NO:613 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:614;

n. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:599, uma HCDR2 de SEQ ID NO:600 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:601; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:615, uma LCDR2 de SEQ ID NO:616 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:617;

o. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:602, uma HCDR2 de SEQ ID NO:603 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:604; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:618, uma LCDR2 de SEQ ID NO:619 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:620; ou

p. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:605, uma HCDR2 de SEQ ID NO:606 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:607; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:621, uma LCDR2 de SEQ ID NO:622 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:623.

[0014] Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7 do presente pedido pode também compreender:

a. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29;

b. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61;

c. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93; ou

d. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:608 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:624.

[0015] Em outra modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7, compreende:

a. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31;

b. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63;

c. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95; ou

d. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:610 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:626.

[0016] O anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, como descrito neste documento, pode compreender uma ou mais substituições de cisteína. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma ou mais substituições de cisteína selecionadas a partir de S152C, S375C, ou ambas S152C e S375C da cadeia pesada do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU. Um anticorpo como aqui revelado pode ser um anticorpo monoclonal.

[0017] O presente pedido divulga um conjugado de anticorpo e fármaco compreendendo a fórmula:

$$Ab—(L—(D)_m)_n$$

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável; em que

Ab é um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antígeno como aqui revelado;

L é um ligante;

D é uma porção de fármaco;

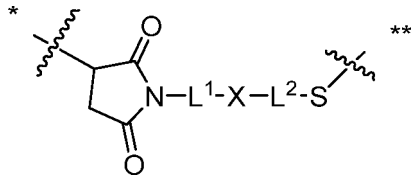
m é um número inteiro de 1 a 8; e

n é um número inteiro de 1 a 12.

[0018] Em certas modalidades, m é 1. Em uma modalidade, n é cerca de 3 a cerca de 4. Em uma modalidade, o ligante é selecionado a partir do grupo consistindo em um ligante clivável, um ligante não clivável, um ligante hidrofílico, um ligante procarregado e um ligante à base de ácido dicarboxílico.

[0019] Em uma modalidade, o ligante é derivado de um reagente de reticulação selecionado a partir do grupo consistindo em N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidila (SPP), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidila (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), iodoacetato de N-succinimidila (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-succinimidila (SMCC), 4-(maleimidometil) ciclo-hexanocarboxilato de N-sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC), e 17-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetra-aza-heptadecan-1-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (CX1-1).

[0020] Em outras modalidades, o ligante tem a seguinte fórmula (fórmula IIA):



(IIA);

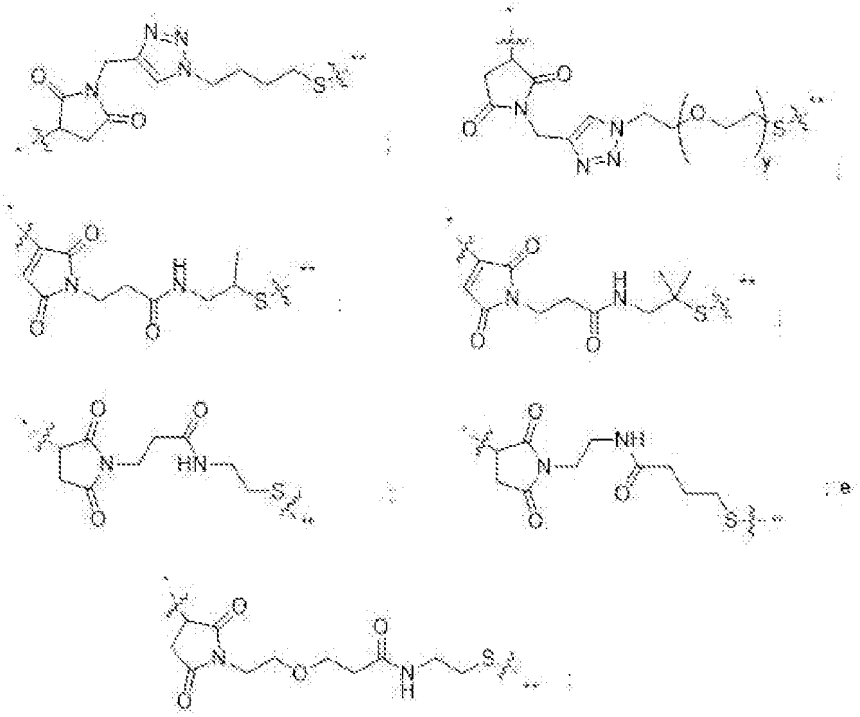
em que * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol de uma porção de fármaco; e em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado.

[0021] Em outra modalidade, o ligante tem a seguinte Fórmula:

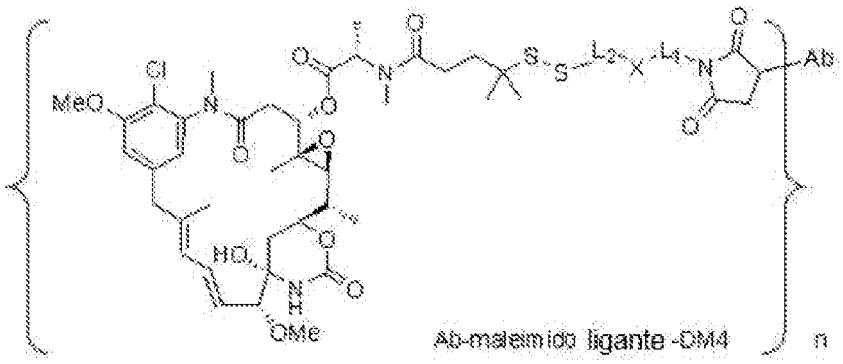


em que y é 1 a 11; * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol da porção de fármaco.

[0022] Em uma modalidade, a porção de fármaco é selecionada de entre um grupo consistindo em um inibidor de V-ATPase, um agente pró-apoptótico, um inibidor de Bcl2, um inibidor de MCL1, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizante de microtúbulo, um desestabilizante de microtúbulo, uma auristatina, uma amanitina, uma pirrolobenzodiazepina, um inibidor de RNA polimerase, uma dolastatina, um maitansinoide, uma MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, inibidores de proteassomos, inibidores de reações de transferência de fosforila em mitocôndrias, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de quinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de quinesina, um inibidor de HDAC, um agente de danificação de DNA, um agente alquilante de DNA, um intercalante de DNA, um aglutinante de sulco menor de DNA e um inibidor de DHFR. Em certas modalidades, o agente citotóxico é um maitansinoide, em que o maitansinoide é N(2')- diacetil-N(2')-(3-mercapto-

l-oxopropil)-maitansina (DM1), N(2')-diacetil-N(2')-(4-mercapto-1-oxo-pentil)-maitansina (DM3) ou N(2')-diacetil-N2-(4- mercapto-4-metil- 1 -oxopentil)-maitansina (DM4).

[0023] Em uma modalidade, os conjugados de anticorpo e fármaco aqui divulgados compreendem a seguinte fórmula (VIII):



Ab-maleimido ligante-DM4

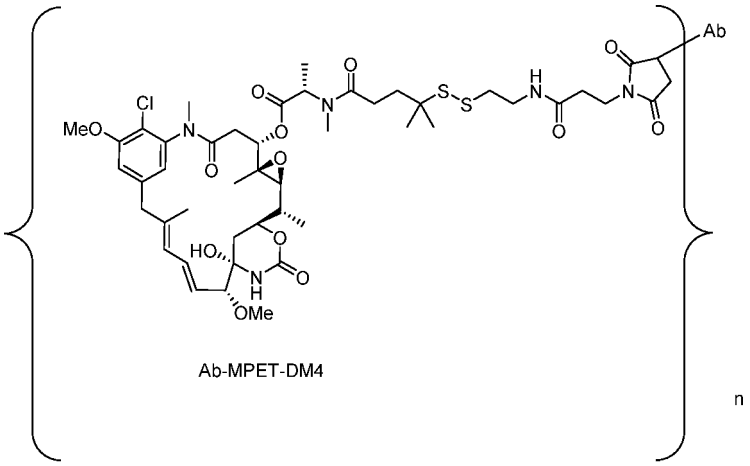
(VIII)

em que L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado; e em que n é cerca de 3 a cerca de 4; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável

[0024] Em uma modalidade, os conjugados de anticorpo e fármaco aqui divulgados têm a seguinte fórmula:



Ab-MPET-DM4

em que n é cerca de 3 a cerca de 4 e Ab é um anticorpo compreen-

dendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

[0025] O presente pedido divulga também uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos, ou seus fragmentos de ligação a antígenos, aqui divulgados e um veículo farmaceuticamente aceitável. O presente pedido também divulga uma composição farmacêutica compreendendo os conjugados de anticorpo e fármaco como aqui divulgados.

[0026] O presente pedido também divulga métodos de tratamento e prevenção do câncer em um paciente com necessidade dos mesmos, compreendendo administrar ao referido paciente os conjugados de anticorpo e fármaco ou as composições farmacêuticas aqui divulgadas, em que o câncer expressa CCR7.

[0027] Em certas modalidades dos métodos de tratamento ou prevenção de câncer, o conjugado de anticorpo e fármaco ou composição farmacêutica são administrados ao paciente em combinação com um ou mais compostos terapêuticos adicionais. Em uma modalidade, o um ou mais compostos terapêuticos adicionais são selecionados de entre um padrão de tratamento quimioterapêutico, uma molécula coestimulatória ou um inibidor de ponto de verificação. Em uma modalidade, a molécula coestimulatória é selecionada a partir de um agonista de ligante OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, STING ou CD83. Em outra modalidade, o inibidor de ponto de verificação é selecionado a partir de um inibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e/ou TGFR beta.

[0028] O presente pedido também divulga os conjugados de anticorpo e fármaco ou as composições farmacêuticas aqui divulgadas,

para uso como um medicamento. Em uma modalidade, os conjugados de anticorpo e fármaco ou as composições farmacêuticas aqui divulgadas são para uso no tratamento ou prevenção de um câncer expressando CCR7 em um paciente com necessidade dos mesmos.

[0029] Em uma modalidade, o pedido divulga o uso dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, os conjugados de anticorpo e fármaco ou a composição farmacêutica como aqui divulgados, para tratar ou prevenir um câncer expressando CCR7 em um paciente com necessidade dos mesmos.

[0030] Em uma modalidade, o pedido divulga o uso dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, os conjugados de anticorpo e fármaco ou as composições farmacêuticas como aqui divulgados, no fabrico de um medicamento.

[0031] Em uma modalidade, o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), carcinoma gástrico, câncer do pulmão de células não pequenas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer da cabeça e do pescoço, carcinoma nasofaríngeo (NPC), câncer do esôfago, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer da tireoide, câncer da mama, câncer de células renais e câncer do colo do útero. Em modalidades específicas, o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) e câncer do pulmão de células não pequenas.

[0032] O presente pedido também divulga ácidos nucleicos que codificam os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno como aqui divulgados. Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NOs: 14, 16, 30, 32, 46, 48, 62, 64, 78, 80, 94, 96, 481, 483, 497 ou 499. Este pedido também divulga vetores compreendendo os ácidos nucleicos e células hospedeiras compreendendo os vetores ou ácidos nucleicos. Este pedido também divulga um processo para produzir os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno aqui divulgados compreendendo o cultivo da célula hospedeira e recuperação do anticorpo a partir da cultura celular. Em uma modalidade, o processo de recuperação do anticorpo a partir da cultura celular compreende as etapas de:

a) remover células e filtrar a cultura;

b) purificar a cultura por cromatografia de afinidade;

c) inativar quaisquer vírus na cultura ajustando o pH para 3,4-3,6, reajustando depois o pH para 5,8-6,2 e filtrando a cultura;

d) purificar a cultura por meio de cromatografia de troca catiônica e realizar redução da cultura dentro da coluna;

e) realizar cromatografia de troca aniônica na cultura;

f) remover vírus por nanofiltração;

g) filtrar a cultura contendo o anticorpo; e

h) obter anticorpo purificado.

[0033] Ainda em outra modalidade, é aqui divulgado um processo para a produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco compreendendo:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



em que:

a porção de fármaco é DM1, DM3 ou DM4 e a porção de fármaco está ligada ao ligante através da sua funcionalidade tiol;

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

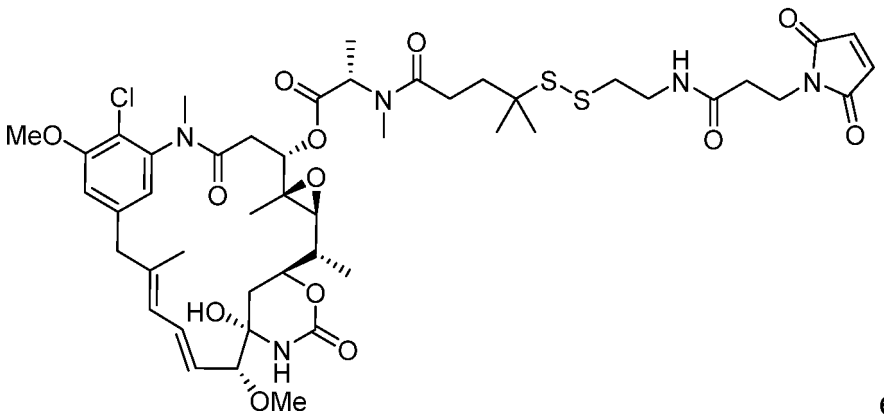
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado;

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo recuperado da cultura celular aqui divulgada para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

[0034] Em uma modalidade, o processo compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



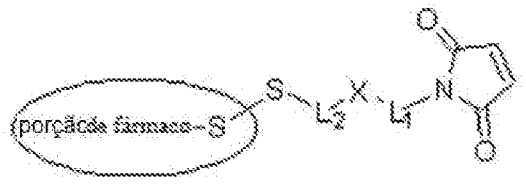
e

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo recuperado da cultura celular aqui divulgada para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

[0035] Em outra modalidade, o processo para a produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



em que:

a porção de fármaco é DM1, DM3 ou DM4 e a porção de fármaco está ligada ao ligante através da sua funcionalidade tiol;

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

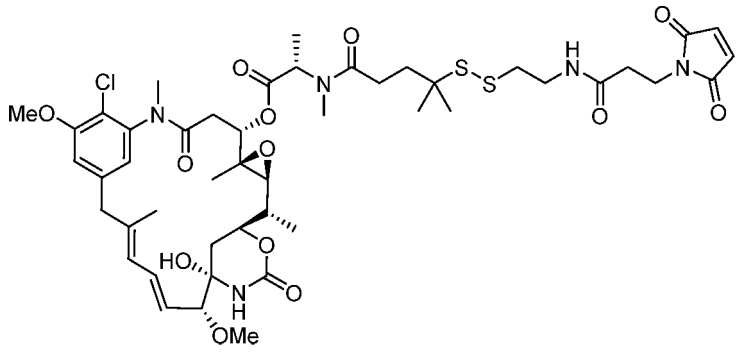
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado;

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com um anticorpo como aqui divulgado para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

[0036] Em outra modalidade, o processo para a produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:

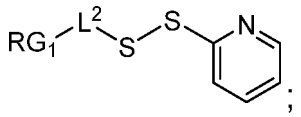


(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno como aqui divulgado, para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

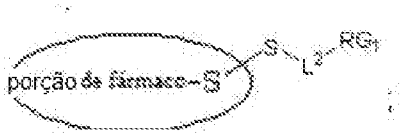
[0037] Em outra modalidade, a etapa de pré-formar a referida porção de ligante-fármaco compreende:

a) reagir uma porção de fármaco através da sua funcionalidade tiol com:



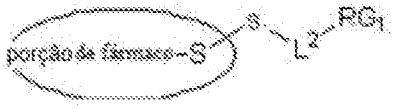
;

para formar:

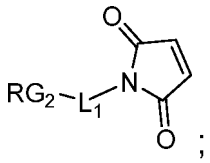


;

b) reagir o

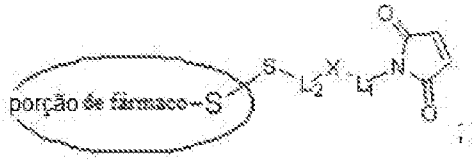


formado com:



;

para formar a porção de ligante-fármaco:



;

em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

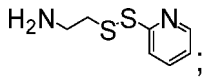
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

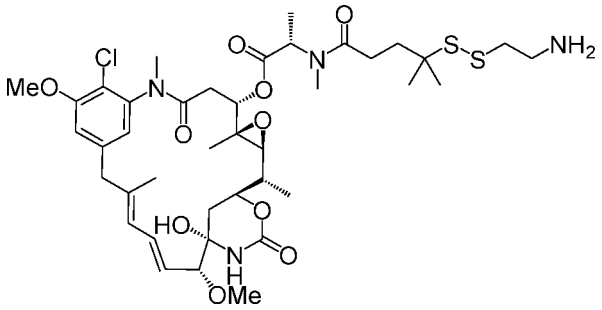
RG1 e RG2 são 2 grupos reativos formando o grupo X.

[0038] Em outra modalidade, a etapa de pré-formar a referida porção de ligante-fármaco compreende:

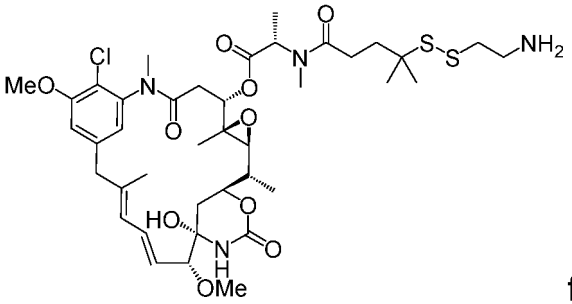
a) reagir a porção de fármaco através da sua funcionalidade de tiol com:

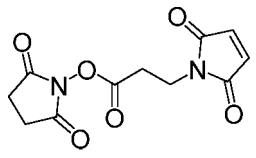

;

para formar:

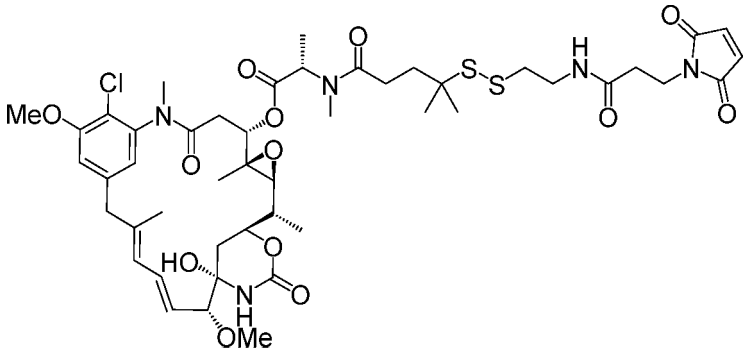

;

b) reagir o


formado com:


;

para formar a porção de ligante-fármaco:


.

[0039] Em certas modalidades, um conjugado de anticorpo e fármaco feito de acordo com os processos acima tem uma DAR média, medida com um espectrofotômetro UV, de cerca de 3 a cerca de 4.

[0040] Ainda em outra modalidade, este pedido divulga um processo para a produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco compreendendo:

(a) ligar quimicamente SMCC ou MPET a uma porção de fármaco DM-1 ou DM-4 para formar um ligante-fármaco;

(b) conjugar o referido ligante-fármaco com um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno como aqui divulgado; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

[0041] Em uma modalidade, o conjugado de anticorpo e fármaco feito de acordo com este processo tem uma DAR média, medida com um espectrofotômetro UV, de cerca de 3 a cerca de 4.

[0042] O presente pedido também divulga um reagente de diagnóstico compreendendo um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno como aqui divulgado. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno é marcado com um radiomarcador, um fluoróforo, um cromóforo, um agente de imagiologia ou um íon metálico.

Breve Descrição dos Desenhos

[0043] A Figura 1 mostra dados experimentais em atividade ADCC *in vitro* de anticorpos anti-CCR7 humanizados e não humanizados em formato CysMab usando um ensaio de repórter ADCC substituto.

[0044] A Figura 2 mostra dados experimentais em atividade ADCC *in vitro* de versões DAPA mutadas por Fc de anticorpos anti-CCR7 não humanizados usando um ensaio de repórter ADCC substituto.

[0045] A Figura 3 mostra dados experimentais de ligação a hCCR7 recombinante por anticorpos anti-CCR7 em formato CysMab.DAPA usando um ensaio de base ELISA.

[0046] A Figura 4A-C mostra dados experimentais acerca da funcionalidade de anticorpos anti-CCR7 parentais usando um ensaio de β-Arrestina em modo agonista (Figura 4A) e modo antagonista (Figura 4B, Figura 4C).

[0047] A Figura 5 mostra dados experimentais da competição com o ligante CCR7 por anticorpos anti-CCR7 em formato CysMab.DAPA usando um ensaio FACS.

[0048] A Figura 6 mostra dados experimentais de mapeamento de epitopos de anticorpos anti-CCR7 parentais usando proteínas CCR7 mutadas.

[0049] A Figura 7A-B mostra dados experimentais de ensaios ADC (pgADC) piggyback de anticorpos anti-CCR7 parentais complexados com um fragmento de anticorpo secundário conjugado com carga útil.

[0050] A Figura 8 mostra dados experimentais de ensaio de extermínio ADC (pgADC) piggyback de efeitos citotóxicos de Ab parental 121G12 complexado com um fragmento de anticorpo secundário conjugado com carga útil usando linhagens celulares alvo negativas.

[0051] A Figura 9 mostra gráficos ilustrando depleção celular CD4+ e CD8a+ T com Ab parental 121G12 de camundongo com reatividade cruzada a CCR7 em um formato Fc de tipo selvagem CysMab, como anticorpo isolado ou conjugado com uma citotoxina auristatina, cujos efeitos são resgatados mudando para um formato Fc silenciado quanto a DAPA.

[0052] A Figura 10 mostra um gráfico ilustrando eficácia de resposta à dose de conjugados de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 e 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 em um modelo de xenoenxerto de mieloma múltiplo KE97.

[0053] A Figura 11 mostra um gráfico ilustrando a atividade de conjugados de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 e 121G12.sSPDB.DM4 em um modelo de mieloma múltiplo KE97

com doseamento iniciado em uma carga tumoral inicial superior à da Fig. 10.

[0054] A Figura 12 mostra um gráfico ilustrando atividade *in vivo* de conjugado 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 em um modelo de tumor do pulmão de células não pequenas primário HLUX1934.

[0055] A Figura 13 mostra um gráfico ilustrando atividade de 684E12.SMCC.DM1 parental conjugado em um modelo de xenoenxerto de mieloma múltiplo KE97.

[0056] A Figura 14A-B mostra imagens IHC de fosfo-Histona H3 (Figura 14A) e sinal quantificado de fosfo-Histona H3 (Figura 14B) nos tumores KE97 às 48 horas pós-tratamento de dose única de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2, 5 ou 10 mg/kg ou controle de isotipo IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg, demonstrando indução de detenção mitótica (fosfo-histona H3) após tratamento com ADC anti-CCR7.

[0057] A Figura 15 mostra um gráfico ilustrando eficácia de resposta a dose de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra um modelo de xenoenxerto de ABC-DLBCL OCI-LY3.

[0058] A Figura 16 mostra um gráfico ilustrando eficácia de resposta a dose de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra um modelo de xenoenxerto de GCB-DLBCL Toledo.

[0059] A Figura 17 mostra um gráfico ilustrando eficácia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra um modelo de xenoenxerto de ALCL DEL.

[0060] A Figura 18 mostra um gráfico ilustrando eficácia de resposta a dose de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra um modelo de xenoenxerto derivado de paciente NSCLC HLUX1787.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

[0061] A não ser que determinado de outro modo, os seguintes

termos e sintagmas, conforme usados no presente documento devem ter os seguintes significados:

[0062] O termo "alquila" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto saturado monovalente que tem o número especificado de átomos de carbono. Por exemplo, alquila C_{1-6} refere-se a um grupo alquila que tem de 1 a 6 átomos de carbono. Os grupos alquila podem ser retos ou ramificados. Os grupos alquila representativos têm uma, duas ou três ramificações. Os exemplos de grupos alquila incluem, porém sem limitação, metila, etila, propila (n-propila e isopropila), butila (n-butila, isobutila, sec-butila e t-butila), pentila (n-pentila, isopentila e neopentila) e hexila. O termo "alquileno" é a forma bivalente de "alquila".

[0063] O termo "anticorpo" como usado aqui refere-se a um polipeptídeo da família das imunoglobulinas que é capaz de se ligar não covalentemente a um correspondente antígeno, de forma reversível, e de maneira específica. Por exemplo, um anticorpo IgG de ocorrência natural é um tetrâmero que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável de cadeia leve (abreviada no presente documento como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida por um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinadoras da complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que estão mais conservadas, denominadas regiões *framework* (FR). Cada VH e VL é composta por três CDR e quatro FR, dispostas a partir do terminal amino para o terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1,

CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve podem conter um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complementar clássico.

[0064] O termo "anticorpo" inclui, mas não se limita a, anticorpos monoclonais, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para anticorpos da invenção). Os anticorpos podem ser de qualquer isotipo/classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

[0065] "Domínios determinantes de complementaridade" ou "regiões determinantes de complementaridade" ("CDR") referem-se de forma intercambiável às regiões hipervariáveis de VL e VH. Os CDR são o local de ligação a proteína-alvo das cadeias de anticorpo que abrigam especificidade para tal proteína-alvo. Há três CDR (CDR1-3, numeradas sequencialmente a partir do terminal N) em cada VL ou VH humana, constituindo cerca de 15 a 20% dos domínios variáveis. As CDR são estruturalmente complementares ao epitopo da proteína-alvo e são, assim, diretamente responsáveis pela especificidade de ligação. Os prolongamentos restantes da VL ou VH, as assim chamadas regiões de *framework*, exibem menos variação em sequência de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4ª edição, Capítulo 4. W.H. Freeman & Co., Nova Iorque, 2000).

[0066] As posições das CDR e regiões de *framework* podem ser determinadas usando várias definições bem conhecidas na técnica, por exemplo, Kabat, Chothia, international ImMunoGeneTics database (IMGT) (disponível na web em www.imgt.org/) e AbM (consultar, por

exemplo, Johnson *et al.*, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Definições de locais de combinação de antígenos são também descritas nas seguintes obras: Ruiz *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:219–221 (2000); e Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); e Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268–9272 (1989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203:121–153 (1991); e Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141–172 (1996).

[0067] Ambas as cadeias leve e pesada são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e “variável" são usados funcionalmente. Nesse sentido, será percebido que os domínios variáveis de ambas as porções de cadeia leve (VL) e pesada (VH) determinam reconhecimento e especificidade de antígeno. Consequentemente, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes, tal como secreção, mobilidade transplacentária, ligação a receptor Fc, ligação a complemento e similares. Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta conforme se tornam mais distais do local de ligação ao antígeno ou terminal amino do anticorpo. O terminal N é uma região variável e no terminal C é uma região constante; os domínios CH3 e CL realmente compreendem os domínios carbóxi-terminais da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[0068] O termo "fragmento de ligação ao antígeno", conforme usado no presente documento, refere-se a uma ou mais porções de um anticorpo que mantêm a capacidade de interagir especificamente com (por exemplo, por ligação, impedimento estérico, estabilização/desestabilização, distribuição espacial) um epitopo de um antíge-

no. Exemplos de fragmentos de ligação incluem, mas não se limitam a, Fvs de cadeia única (scFv); anticorpos de camelídeos, Fvs ligados a dissulfeto (sdFv); fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), um fragmento monovalente consistindo dos domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento F(ab)2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo; um fragmento dAB (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consiste em um domínio VH; e uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou outros fragmentos de ligação a epitopos de um anticorpo.

[0069] Além do mais, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam preparados como uma única cadeia de proteína na qual as regiões VL e VH emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); consultar, por exemplo, Bird *et al*. Science 242: 423 a 426, 1988; e Huston *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879 a 5883, 1988). Tais anticorpos de cadeia única se destinam também a serem abrangidos pelo termo "fragmento de ligação ao antígeno". Estes fragmentos de ligação ao antígeno são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas dos peritos na técnica, e os fragmentos são rastreados quanto à utilidade do mesmo modo que o são anticorpos intatos.

[0070] Fragmentos de ligação ao antígeno podem também ser incorporados em anticorpos de domínio único, maxicorpos, minicorpos, anticorpos de domínio único, intracorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, v-NAR e bis-scFv (ver, por exemplo, Hollinger e Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Fragmentos de ligação ao an-

tígeno podem ser enxertados em moldes baseados em polipeptídeos como uma fibronectina tipo III (Fn3) (ver patente U.S. Nº 6,703,199, que descreve monocorpos polipeptídicos de fibronectina).

[0071] Fragmentos de ligação ao antígeno podem ser incorporados em moléculas de cadeia única que compreendem um par de segmentos de Fv em tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, juntamente com polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação ao antígeno (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8:1.057 a 1.062, 1995; e Patente U.S. Nº 5.641.870).

[0072] O termo "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usado no presente documento, refere-se a polipeptídeos, incluindo anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que têm sequência de aminoácidos substancialmente idêntica ou são derivados da mesma fonte genética. O termo também inclui preparações de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma única especificidade e afinidade de ligação a um epitopo particular.

[0073] O termo "anticorpo humano", conforme usado no presente documento, inclui anticorpos que têm regiões variáveis em que tanto as regiões de *framework* quanto CDR são derivadas de sequências de origem humana. Além disso, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante também é derivada de tais sequências humanas, por exemplo, sequências de linhagem germinativa humana, ou versões com mutação de sequências de linhagem germinativa humana, ou anticorpo contendo sequências de *framework* consenso derivadas da análise de sequências de *framework* humanas, por exemplo, conforme descrito em Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57 a 86, 2000). São também incluídos anticorpos derivados de sequências humanas em que uma ou mais CDR foi mutada para maturação de afinidade ou para propósitos de conjugação de fabrico/carga útil. Consultar Kilpat-

rick *et al.*, "Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS," Hybridoma. Agosto de 1997;16(4):381-9.

[0074] Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica de local *in vitro,* ou por mutação somática *in vivo*, ou uma substituição conservadora para promover estabilidade ou fabricação).

[0075] O termo "reconhecer", conforme usado no presente documento, refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que encontra e interage (por exemplo, se liga) com seu epitopo, seja esse epitopo linear ou conformacional. O termo "epitopo" refere-se a um sítio em um antígeno ao qual um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção se liga especificamente. Os epitopos podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos quanto de aminoácidos não contíguos justapostos por enovelamento terciário de uma proteína. Os epitopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos em exposição para desnaturar solventes, enquanto os epitopos formados por enovelamento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epitopo tipicamente inclui pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial exclusiva. Métodos para determinar a conformação espacial de epitopos incluem técnicas na técnica, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional (ver, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Volume 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0076] O termo "afinidade", conforme usado no presente documento, refere-se à força de interação entre anticorpo e antígeno em sítios antigênicos únicos. Dentro de cada sítio antigênico, a região variável do "braço" de anticorpo interage através de forças não covalentes fra-

cas com antígeno em diversos locais; quanto mais interações, mais forte a afinidade.

[0077] O termo "anticorpo isolado" refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigênicas. Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um antígeno pode, no entanto, ter reatividade cruzada a outros antígenos. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou produtos químicos.

[0078] O termo "sequência de linhagem germinativa humana correspondente" refere-se à sequência de ácidos nucleicos que codificam uma sequência ou subsequência de aminoácidos de região variável humana que compartilha a identidade de sequência de aminoácidos determinada mais alta com uma sequência ou subsequência de aminoácidos de região variável de referência em comparação com todas as outras sequências de aminoácidos de região variável conhecidas codificadas por sequências de região variável de imunoglobulina de linhagem germinativa humanas. A sequência de linhagem germinativa humana correspondente pode também se referir à sequência ou subsequência de aminoácidos de região variável humana com a identidade de sequência de aminoácidos mais alta com uma sequência ou subsequência de aminoácidos de região variável de referência em comparação com todas as outras sequências de aminoácidos de região variável avaliadas. A correspondente sequência de linha germinativa podem ser apenas regiões de *framework*, apenas regiões determinantes de complementaridade, regiões determinantes de complementaridade e de *framework*, um segmento variável (como definido acima), ou outras combinações de sequências ou subsequências que compreendam uma região variável. A identidade de sequência pode ser determinada com o uso dos métodos descritos no presente documento, por exemplo, alinhando duas sequências usando BLAST, ALIGN ou

outro algoritmo de alinhamento conhecido na técnica. A sequência de ácidos nucleicos ou aminoácidos de linha germinativa humana correspondente pode ter pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de ácidos nucleicos ou aminoácidos de região variável de referência. Sequências de linha germinativa humanas podem ser determinadas, por exemplo, através da base de dados internacional ImMunoGeneTics publicamente disponível (IMGT) (disponível na web em www.imgt.org/) e base V (disponível na web em vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

[0079] A expressão "se liga especificamente" ou "se liga seletivamente," quando usado no contexto de descrição da interação entre um antígeno (por exemplo, uma proteína) e um anticorpo, fragmento de anticorpo ou agente de ligação derivado de anticorpo, refere-se a uma reação de ligação que é determinativa da presença do antígeno em uma população heterogênea de proteínas e outros produtos biológicos, por exemplo, em uma amostra biológica, por exemplo, uma amostra de sangue, soro, plasma ou tecido. Desse modo, sob certas condições de imunoensaio designadas, os anticorpos ou agentes de ligação com uma especificidade de ligação particular se ligam a um antígeno particular pelo menos duas vezes o antecedente e não se ligam substancialmente em uma quantidade significativa a outros antígenos presentes na amostra. Em uma modalidade, sob condições de imunoensaio designadas, o anticorpo ou agente de ligação com uma especificidade de ligação particular se liga a um antígeno particular pelo menos dez (10) vezes o antecedente e não se liga substancialmente em uma quantidade significativa a outros antígenos presentes na amostra. A ligação específica a um anticorpo ou agente de ligação sob tais condições pode exigir que o anticorpo ou agente seja selecionado pela sua especificidade para uma proteína particular. Conforme desejado

ou adequado, essa seleção pode ser atingida subtraindo anticorpos que sofrem reação cruzada com moléculas de outras espécies (por exemplo, camundongo ou rato) ou outros subtipos. Alternativamente, em certas modalidades, são selecionados anticorpos ou fragmentos de anticorpo que sofrem reação cruzada com certas moléculas desejadas.

[0080] Podem ser usados vários formatos de imunoensaios para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína particular. Por exemplo, imunoensaios ELISA de fase sólida são rotineiramente usados para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína (ver, por exemplo, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para uma descrição de formatos de imunoensaios e condições que podem ser usados para determinar imunorreatividade específica). Tipicamente, uma reação de ligação específica ou seletiva produzirá um sinal pelo menos duas vezes o sinal de fundo e mais tipicamente pelo menos 10 a 100 vezes maior que o fundo.

[0081] A expressão "constante de dissociação de equilíbrio (KD, M)" refere-se à constante de taxa de dissociação (kd, tempo-1) dividida pela constante de taxa de associação (ka, tempo-1, M-1). As constantes de dissociação em equilíbrio podem ser medidas com o uso de qualquer método conhecido na técnica. Os anticorpos da presente invenção geralmente têm uma constante de dissociação de equilíbrio inferior a cerca de 10^{-7} ou 10^{-8} M, por exemplo inferior a cerca de 10^{-9} M ou 10^{-10} M, em certas modalidades inferior a cerca de 10^{-11} M, 10^{-12} M ou 10^{-13} M.

[0082] O termo "biodisponibilidade" refere-se à disponibilidade sistêmica (isto é, níveis sanguíneos/plasmáticos) de uma dada quantidade de fármaco administrado a um paciente. A biodisponibilidade é um termo absoluto que indica medição tanto do tempo (taxa) quanto da

quantidade total (extensão) de fármaco que atinge a circulação geral de uma forma de dosagem administrada.

[0083] Conforme usado no presente documento, o sintagma "que consiste essencialmente em" refere-se aos gêneros ou espécies de agentes farmacêuticos ativos incluídos em um método ou composição, assim como quaisquer excipientes inativos para o propósito destinado dos métodos ou composições. Em certas modalidades, a expressão "que consiste essencialmente em" exclui expressamente a inclusão de um ou mais agentes ativos adicionais além de um conjugado de anticorpo e fármaco da invenção. Em certas modalidades, a expressão "que consiste essencialmente em" exclui expressamente a inclusão de um ou mais agentes ativos adicionais além de conjugado de anticorpo e fármaco da invenção e um segundo agente coadministrado.

[0084] O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos de ocorrência natural, sintéticos e não naturais, assim como análogos de aminoácido e miméticos de aminoácido que funcionam de uma maneira similar aos aminoácidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, assim como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato e O-fosfosserina. Análogos de aminoácido referem-se a compostos que têm a mesma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural, isto é, um α-carbono que está ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino e um grupo R, por exemplo, homosserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Tais análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou cadeias principais peptídicas modificadas, mas mantêm a mesma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural. Miméticos de aminoácido referem-se a compostos químicos que têm uma estrutura diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funciona de

uma maneira similar a um aminoácido de ocorrência natural.

[0085] A expressão "variante conservativamente modificada" se aplica a sequências tanto de aminoácidos quanto ácidos nucleicos. Em relação a sequências de ácidos nucleicos particulares, variantes conservativamente modificadas referem-se àqueles ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas ou em que o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácidos a sequências essencialmente idênticas. Devido à degenerescência do código genético, um número grande de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica qualquer dada proteína. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU codificam o aminoácido alanina. Desse modo, em cada posição em que uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácido nucleico são "variações silenciosas", que são uma espécie de variações conservativamente modificadas. Cada sequência de ácidos nucleicos no presente documento que codifica um polipeptídeo também descreve todas as variações silenciosas possíveis do ácido nucleico. O versado na técnica reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que é comumente o único códon para metionina, e TGG, que é comumente o único códon para triptofano) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Consequentemente, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo está implícita em cada sequência descrita.

[0086] Para sequências de polipeptídeos, "variantes conservativamente modificadas" incluem substituições, deleções ou adições individuais a uma sequência de polipeptídeos que resulta na substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. As tabelas de substituição conservadora que fornecem aminoácidos funcio-

nalmente similares são bem conhecidas na técnica. Tais variantes modificadas de forma conservadora são adições a, e não excluem, variantes polimórficas, homólogos interespécies e alelos da invenção. Os oito grupos seguintes contêm aminoácidos que são substituições conservadoras uns dos outros: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por exemplo, Creighton, Proteins (1984)). Em certas modalidades, a expressão "modificações de sequências conservadoras" é usada para referir modificações de aminoácidos que não afetam nem alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo a sequência de aminoácidos.

[0087] O termo "otimizado" conforme usado no presente documento refere-se a uma sequência de nucleotídeos que foi alterada para codificar uma sequência de aminoácidos usando códons que são preferenciais na célula ou organismo de produção, de modo geral, uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de levedura, uma célula de Pichia, uma célula fúngica, uma célula de Trichoderma, uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou uma célula humana. A sequência de nucleotídeos otimizada é geneticamente modificada para manter completamente, ou o máximo possível, a sequência de aminoácidos originalmente codificada pela sequência de nucleotídeos de partida, que é também conhecida como a sequência "parental".

[0088] As expressões "porcentagem de identidade" ou "identidade percentual", no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, referem-se até que ponto duas ou mais sequências ou subsequências são iguais. Duas sequências são "idênticas" se tiverem a mesma sequência de aminoácidos ou nucleotídeos

na região que é comparada. Duas sequências são "substancialmente idênticas" se duas sequências tiverem uma percentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são iguais (isto é, com 60% de identidade, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99% de identidade ao longo de uma região especificada, ou, quando não especificado, ao longo de toda a sequência), quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima ao longo de uma janela de comparação, ou região designada, medidas usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequências ou por alinhamento manual e inspeção visual. Opcionalmente, a identidade existe ao longo de uma região que tem pelo menos cerca de 30 nucleotídeos (ou 10 aminoácidos) de comprimento, ou mais preferencialmente ao longo de uma região que tem 100 até 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos (ou 20, 50, 200 ou mais aminoácidos) de comprimento.

[0089] Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como sequência de referência com a qual sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de teste e de referência são inseridas em um computador, são designadas coordenadas de subsequências, se necessário, e são designados parâmetros do programa de algoritmo de sequências. Parâmetros predefinidos do programa podem ser usados, ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequências calcula então as identidades percentuais das sequências para as sequências de teste relativamente à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa.

[0090] Uma "janela de comparação", conforme usado no presente documento, inclui a referência a um segmento de qualquer uma das diversas posições contíguas selecionadas dentre o grupo que consiste em de 20 a 600, usualmente cerca de 50 a cerca de 200, mais usualmente cerca de 100 a cerca de 150, em que uma sequência pode ser

comparada a uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências serem idealmente alinhadas. Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pela pesquisa por método de similaridade de Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por alinhamento manual e inspeção visual (ver, por exemplo, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

[0091] Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a identidade percentual de sequência e similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3.389 a 3.402, 1977; e Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 a 410, 1990, respectivamente. O software para realizar análise BLAST está publicamente disponível junto ao National Center for Biotechnology Information. Esse algoritmo envolve identificar primeiramente pares de sequência de elevada semelhança (HSP) identificando palavras pequenas de comprimento W na sequência de consulta, que se correspondem ou satisfazem alguma pontuação T de limite de valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados. T é denominado o limite de pontuação de palavra de proximidade (Altschul *et al.*, supra). Estas correspondências de palavra de proximidade iniciais atuam como sementes para a iniciação de buscas para se encontrar HSP mais longos contendo as mesmas. As correspondências de pala-

vras são prolongadas em ambas as direções ao longo de cada sequência tanto quanto a pontuação de alinhamento cumulativa possa ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, para sequência de nucleotídeos, os parâmetros M (pontuação de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre > 0) e N (pontuação de penalização para resíduos não correspondentes; sempre < 0). Para sequências de aminoácidos, é usada uma matriz de pontuação para calcular a pontuação cumulativa. A extensão das correspondências de palavra em cada direção é interrompida quando: a pontuação de alinhamento cumulativa cai de uma quantidade X a partir do seu valor máximo alcançado; a pontuação cumulativa tende para zero ou menos devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa; ou é alcançada a extremidade de qualquer uma das sequências. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T e X determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) ou 10, M=5, N=-4 e uma comparação de ambas as fitas. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra de 3 e expectativa (E) de 10, e os alinhamentos de matriz de pontuação BLOSUM62 (consultar Henikoff e Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 e uma comparação de ambas as fitas.

[0092] O algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (consultar, por exemplo, Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5.873 a 5.787, 1993). Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos poderia ocorrer ao acaso. Por exemplo, um

ácido nucleico é considerado similar a uma sequência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação do ácido nucleico de teste com o ácido nucleico de referência for menor do que cerca de 0,2, mais preferencialmente, menor do que cerca de 0,01 e, com máxima preferência, menor do que cerca de 0,001.

[0093] A identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11 a 17 (1988) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalos de 12 e uma penalidade de intervalos de 4. Adicionalmente, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444 a 453 (1970), que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em www.gcg.com), usando uma matriz BLOSUM62 ou uma matriz PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[0094] Além da identidade percentual de sequência indicada acima, outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico possui reatividade imunológica cruzada com os anticorpos que surgem contra o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, conforme descrito abaixo. Desse modo, um polipeptídeo é, tipicamente, substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, quando os dois peptídeos diferem apenas por substituições conservadoras. Outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que as duas moléculas ou seus complementos se hibridizam uns aos outros sob condições estringentes, conforme descrito abaixo. Ainda outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substanci-

almente idênticas é que os mesmos iniciadores podem ser usados para amplificar a sequência.

[0095] O termo "ácido nucleico" é usado no presente documento indistintamente com o termo "polinucleotídeo" e se refere a desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros dos mesmos em forma de fita simples ou de dupla fita. O termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos de nucleotídeo conhecidos ou resíduos ou ligações de cadeia principal modificados, que são sintéticos, de ocorrência natural e de ocorrência não natural, que têm propriedades de ligação similares como o ácido nucleico de referência e que são metabolizados de uma maneira similar aos nucleotídeos de referência. Exemplos de tais análogos incluem, sem limite, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metila, fosfonatos de metila quiral, 2-O-metil ribonucleotídeos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

[0096] A menos que indicado de outro modo, uma sequência de ácido nucleico particular abrange também implicitamente variantes conservadoramente modificadas destes (por exemplo, substituições de códons degenerados) e sequências complementares, assim como a sequência indicada explicitamente. Especificamente, conforme detalhado abaixo, podem ser obtidas substituições de códons degenerados gerando sequências em que a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída por resíduos de bases mistas e/ou desóxi-inosina (Batzer *et al.,* (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka *et al.,* (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; e Rossolini *et al.,* (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

[0097] A expressão "ligado de maneira funcional" no contexto de ácidos nucleicos refere-se a uma relação funcional entre dois ou mais segmentos de polinucleotídeo (por exemplo, DNA). Tipicamente, refere-se à relação funcional de uma sequência reguladora transcricional com uma sequência transcrita. Por exemplo, uma sequência promoto-

ra ou intensificadora é ligada de maneira funcional a uma sequência de codificação se estimular ou modular a transcrição da sequência de codificação em uma célula hospedeira adequada ou outro sistema de expressão. De modo geral, sequências reguladoras transcricionais promotoras que são ligadas de maneira funcional a uma sequência transcrita são fisicamente contíguas à sequência transcrita, isto é, são cis-atuantes. Entretanto, algumas sequências reguladoras transcricionais, tais como intensificadores, não precisam ser fisicamente contíguas ou localizadas em estreita proximidade com as sequências de codificação cuja transcrição intensificam.

[0098] Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são usados indistintamente no presente documento para referir um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácido em que um ou mais resíduos de aminoácido são um mimético químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, assim como a polímeros de aminoácido de ocorrência natural e polímero de aminoácido de ocorrência não natural. A não ser que indicado de outro modo, uma sequência de polipeptídeos particular também abrange implicitamente variantes conservadoramente modificadas da mesma.

[0099] A expressão "conjugado de anticorpo e fármaco" ou "imunoconjugado", conforme usado no presente documento, refere-se à ligação de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo com outro agente, tal como um agente quimioterapêutico, uma toxina, um agente imunoterapêutico, uma sonda de imaginologia e similares. A ligação podem ser ligações covalentes ou interações não covalentes, tal como através de forças eletrostáticas. Vários ligantes, conhecidos na técnica, podem ser empregados a fim de formar o conjugado de anticorpo e fármaco. Adicionalmente, o conjugado de anticorpo e fármaco pode ser fornecido na forma de uma proteína de fusão que pode ser expressa a partir de um polinucleotídeo que codifica

o imunoconjugado. Conforme usado no presente documento, "proteína de fusão" refere-se a proteínas criadas através da união de dois ou mais genes ou fragmentos de gene que originalmente codificavam proteínas separadas (incluindo peptídeos e polipeptídeos). A tradução do gene de fusão resulta em uma única proteína com propriedades funcionais derivadas de cada uma das proteínas originais.

[00100] O termo "sujeito" inclui animais humanos e animais não humanos. Os animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, vacas, galinhas, anfíbios e répteis. Exceto quando indicado, os termos "paciente" ou "sujeito" são usados indistintamente no presente documento.

[00101] O termo "citotoxina" ou "agente citotóxico", conforme usado no presente documento, refere-se a qualquer agente que seja prejudicial ao crescimento e proliferação de células e possa atuar para reduzir, inibir ou destruir uma célula ou malignidade.

[00102] A expressão "agente anticancerígeno", conforme usado no presente documento, refere-se a qualquer agente que possa ser usado para tratar ou prevenir um distúrbio de proliferação celular, tal como câncer, incluindo, porém sem limitação, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, radioterapia e agentes radioterapêuticos, agentes anticancerígenos alvejados e agentes imunoterapêuticos.

[00103] A expressão "porção de fármaco" ou "carga útil", conforme usado no presente documento, refere-se a uma porção química que é conjugada com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção e pode incluir qualquer agente terapêutico ou diagnóstico, por exemplo, um agente anticancerígeno, anti-inflamatório, anti-infeccioso (por exemplo, antifúngico, antibacteriano, antiparasítico, antiviral) ou anestésico. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser um agente anticancerígeno, tal como uma citotoxina. Em certas modalidades,

uma porção de fármaco é selecionada dentre um inibidor de V-ATPase, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizante de microtúbulo, um desestabilizante de microtúbulo, uma auristatina, uma dolastatina, um maitansinoide, um MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de RNA polimerase, uma pirrolobenzodiazepina (PBD), uma amanitina, um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, um inibidor de reações de transferência de fosforila em mitocôndrias, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de quinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de proteassomo, um inibidor de quinesina, um inibidor de HDAC, um agente de danificação de DNA, um agente alquilante de DNA, um intercalante de DNA, um aglutinante de sulco menor de DNA e um inibidor de DHFR. Métodos para fixar cada um dos mesmos a um ligante compatível com os anticorpos e o método da invenção são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Singh *et al.*, (2009) Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, volume 525, 445 a 457. Adicionalmente, uma carga útil pode ser uma sonda biofísica, um fluoróforo, uma etiqueta *spin*, uma sonda de infravermelhos, uma sonda de afinidade, um quelador, uma sonda espectroscópica, uma sonda radioativa, uma molécula de lipídio, um polietileno glicol, um polímero, uma etiqueta *spin*, DNA, RNA, uma proteína, um peptídeo, uma superfície, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma nanopartícula, um ponto quântico, um lipossomo, uma partícula PLGA, um sacarídeo ou um polissacarídeo.

[00104] A expressão "porção de fármaco maitansinoide" significa a subestrutura de um conjugado de anticorpo e fármaco que tem a estrutura de um composto maitansinoide. A maitansina foi primeiramente isolada a partir de Maytenus serrata, um arbusto da África Oriental (Patente U.S. Nº 3,896,111). Subsequentemente, foi descoberto que certos micróbios também produzem maitansinoides, tal como maitan-

sinol e ésteres maitansinol C-3 (Patente U.S. Nº 4,151,042). Foram relatados maitansinol sintético e análogos de maitansinol. Consulte as patentes U.S. Nºs 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; e 4.371.533. e Kawai *et al.*. (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451, cada uma das quais é expressamente incorporada por referência. Exemplos de maitansinoides específicos úteis para conjugação incluem DM1, DM3 e DM4.

[00105] "Tumor" refere-se a crescimento e proliferação celular neoplásica, maligno ou benigno, e todas as células e tecidos pré-cancerígenos e cancerígenos.

[00106] A expressão "atividade antitumoral" significa uma redução na taxa de proliferação, viabilidade ou atividade metastática da célula tumoral. Por exemplo, atividade antitumoral pode ser evidenciada por um declínio na taxa de crescimento de células anormais que surge durante a terapia ou estabilidade ou redução do tamanho do tumor, ou sobrevivência prolongada devido a terapia, em comparação com controle sem terapia. Tal atividade pode ser avaliada usando modelos tumorais *in vitro* ou *in vivo* aceites, incluindo, mas não se limitando a, modelos de xenoenxerto, modelos de aloenxerto, modelos MMTV e outros modelos conhecidos, conhecidos na técnica de investigação da atividade antitumoral.

[00107] O termo "malignidade" refere-se a um tumor ou câncer não benigno. Como usado aqui, o termo "câncer" inclui uma malignidade caracterizada por crescimento celular desregulado ou descontrolado. Exemplos de câncer incluem: carcinomas, sarcomas, leucemias e linfomas.

[00108] O termo "câncer" inclui tumores malignos primários (por exemplo, aqueles cujas células não migraram para locais do corpo do

sujeito diferentes do local do tumor original) e tumores malignos secundários (por exemplo, aqueles que surgem a partir de metástase, a migração de células tumorais para locais secundários diferentes do local do tumor original).

[00109] O termo "CCR7" (também conhecido como BLR2, CC-CKR-7, CCR-7, CD197, CDw197, CMKBR7, EBI1 ou Receptor de Quimiocina de Motivo C-C 7) refere-se a um membro da família de receptor acoplado a proteína G. As sequências de ácido nucleico e aminoácido de CCR7 humano foram publicadas no GenBank com os seguintes números de acesso: NP_001829, NP_001288643, NP_001288645, NP_001288646, NP_001288647 (sequências de aminoácidos), e NM_001838, NM_001301714, NM_001301716, NM_001301717, NM_001301718 (sequências de nucleotídeos). Conforme usado no presente documento, o termo "CCR7" é usado para referir coletivamente todas as isoformas de ocorrência natural de proteína CCR7 ou uma variante da mesma.

[00110] O termo "variante" refere-se a um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica a um polipeptídeo de referência ou que é codificado por uma sequência de nucleotídeos substancialmente idêntica e tem capacidade para ter uma ou mais atividades do polipeptídeo de referência. Por exemplo, uma variante pode ter cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência com um polipeptídeo de referência, mantendo simultaneamente uma ou mais atividades do polipeptídeo de referência.

[00111] Como aqui utilizados, os termos “tratar”, “que trata” ou “tratamento” de qualquer doença ou distúrbio referem-se, em uma modalidade, a melhorar a doença ou distúrbio (isto é, retardar, parar ou reduzir o desenvolvimento da doença ou pelo menos de um dos seus sintomas clínicos). Em outra modalidade, “tratar”, “que trata” ou “trata-

mento” refere-se a aliviar ou melhorar pelo menos um parâmetro físico, incluindo aqueles que podem não ser discerníveis pelo paciente. Em ainda outra modalidade, “tratar”, “que trata” ou “tratamento” refere-se à modulação da doença ou distúrbio, seja fisicamente (por exemplo, estabilização de um sintoma discernível), fisiologicamente (por exemplo, estabilização de um parâmetro físico) ou ambos.

[00112] Conforme usado no presente documento, o termo "prevenir", "que previne" ou "prevenção" de qualquer doença ou distúrbio refere-se ao tratamento profilático da doença ou distúrbio; ou retardar o início ou progressão da doença ou distúrbio.

[00113] A expressão "quantidade terapeuticamente aceitável" ou "dose terapeuticamente eficaz" refere-se indistintamente a uma quantidade suficiente para provocar o resultado desejado (isto é, uma redução do tamanho do tumor, inibição de crescimento do tumor, prevenção de metástase, inibição ou prevenção de infecção viral, bacteriana, fúngica ou parasítica). Em certas modalidades, uma quantidade terapeuticamente aceitável não induz nem provoca efeitos secundários indesejáveis. Em certas modalidades, uma quantidade terapeuticamente aceitável induz ou provoca efeitos secundários, mas apenas os que são aceitáveis pelos prestadores de cuidados de saúde tendo em vista o estado de saúde do paciente. Uma quantidade terapeuticamente aceitável pode ser determinada administrando primeiramente uma dose baixa e aumentando, então, incrementalmente essa dose até o efeito desejado ser atingido. Uma "dosagem profilaticamente eficaz” e uma "dosagem terapeuticamente eficaz” das moléculas da invenção podem impedir o início ou resultar em uma diminuição da gravidade, respectivamente, de sintomas da doença, incluindo sintomas associados a câncer.

[00114] O termo "coadministrar" refere-se à presença de dois agentes ativos no sangue de um indivíduo. Os agentes ativos que são co-

administrados podem ser simultânea ou sequencialmente liberados.

[00115] A presente invenção fornece anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e seus conjugados de anticorpo, ou seja, conjugados de anticorpo e fármaco ou ADC, que se ligam a CCR7. Em particular, a presente invenção fornece anticorpos e fragmentos de anticorpo (ou seja, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam a CCR7, e internalizam após tal ligação. Os anticorpos e fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) da presente invenção podem ser usados para produzir conjugados de anticorpo e fármaco. Além disso, a presente invenção fornece conjugados de anticorpo e fármaco que possuem características farmacocinéticas desejáveis e outros atributos desejáveis, e que podem assim ser usados para o tratamento ou prevenção de um câncer que expresse CCR7. A presente invenção fornece adicionalmente composições farmacêuticas que compreendem os conjugados de fármaco de anticorpo da invenção e métodos de produção e uso de tais composições farmacêuticas para o tratamento ou prevenção de câncer.

Conjugados de Anticorpo e Fármaco

[00116] A presente invenção fornece conjugados de anticorpo e fármaco também referidos como imunoconjugados, em que um anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno ou um seu equivalente funcional que se liga especificamente a CCR7 está ligado a uma porção de fármaco. Em um aspecto, os anticorpos, os fragmentos de ligação ao antígeno ou seus equivalentes funcionais da invenção estão ligados, por meio de ligação covalente por um ligante, a uma porção de fármaco que é um agente anticancerígeno. Os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção podem entregar uma dose eficaz de um agente anticancerígeno (por exemplo, agente citotóxico) a tecidos tumorais que expressam CCR7, pelo que pode ser alcançada maior seletividade (e menor dose eficaz).

[00117] Em um aspecto, a invenção fornece um imunoconjugado de Fórmula (I):

$$Ab—(L—(D)_m)_n$$

em que Ab representa anticorpo de ligação a CCR7 aqui descrito;

L é um ligante;

D é uma porção de fármaco;

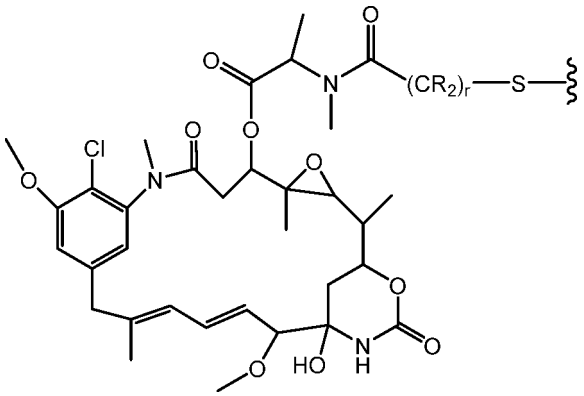
m é um número inteiro de 1 a 8; e

n é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, 2 a 8 ou 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 2, 3 ou 4. Em certas modalidades, m é 1; em outras modalidades, m é 2, 3 ou 4.

[00118] Embora a razão entre fármaco e anticorpo tenha um valor exato para uma molécula de conjugado específica (por exemplo, n multiplicado por m na Fórmula (I)), é entendido que o valor será frequentemente um valor médio quando usado para descrever uma amostra contendo muitas moléculas, devido a algum grau de heterogeneidade, tipicamente associada à etapa de conjugação. O carregamento médio para uma amostra de um imunoconjugado é referido no presente documento como a razão entre fármaco e anticorpo ou "DAR". Em certas modalidades, quando o fármaco é um maitansinoide, é referido como "MAR". Em certas modalidades, a DAR está entre cerca de 2 e cerca de 6 e, tipicamente, é cerca de 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0. Em certas modalidades, pelo menos 50% de uma amostra em peso é um composto que tem a DAR média mais ou menos 2 e, de preferência, pelo menos 50% da amostra é um conjugado que contém a DAR média mais ou menos 1. Modalidades incluem imunoconjugados onde a DAR é cerca de 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 ou 3,9. Em certas modalidades, uma DAR de “cerca de n” significa que o valor medido para DAR está dentro de 20% de n.

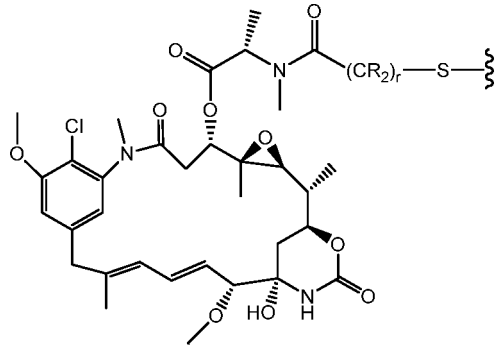
[00119] A presente invenção é também dirigida a imunoconjugados

compreendendo os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e seus equivalentes funcionais como aqui divulgado, ligados ou conjugados a uma porção de fármaco. Em uma modalidade, a porção de fármaco D é uma porção de fármaco maitansinoide, incluindo aquelas possuindo a estrutura:

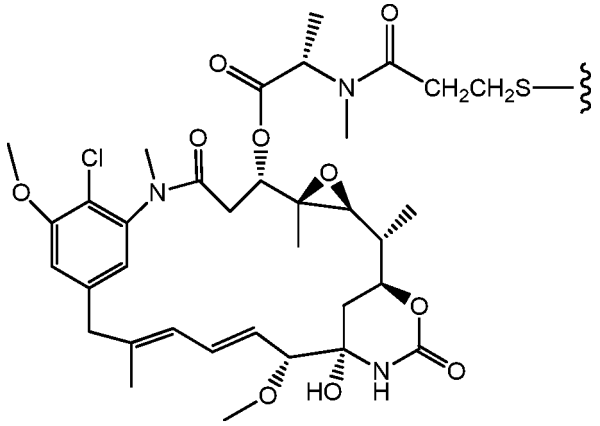


onde a linha ondulada indica a ligação covalente do átomo de enxofre do maitansinoide a um ligante de um conjugado de anticorpo e fármaco. R, a cada ocorrência, é independentemente H ou alquila C_1-C_6. A cadeia de alquileno ligando o grupo amida ao átomo de enxofre pode ser metanila, etanila ou propila, ou seja, r é 1, 2 ou 3. (Patente U.S. nº 633.410, Patente U.S. Nº 5,208,020, Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52;127-131, Lui *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623).

[00120] Todos os estereoisômeros da porção de fármaco maitansinoide são contemplados para os imunoconjugados da invenção, ou seja, qualquer combinação de configurações R e S nos carbonos quirais do maitansinoide. Em uma modalidade, a porção de fármaco maitansinoide tem a seguinte estereoquímica:

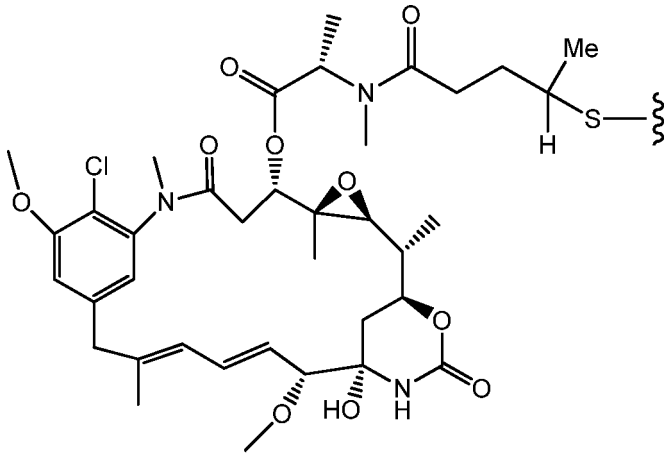


[00121] Em uma modalidade, a porção de fármaco maitansinoide é $N^{2'}$-diacetil-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (também conhecida como DM1). DM1 é representado pela seguinte fórmula estrutural.



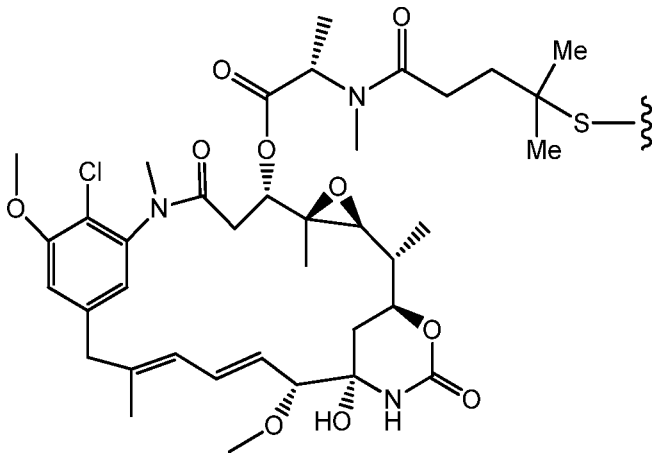
DM1

[00122] Em outra modalidade, a porção de fármaco maitansinoide é $N^{2'}$-diacetil-$N^{2'}$-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (também conhecida como DM3). DM3 é representado pela seguinte fórmula estrutural.



DM3

[00123] Em outra modalidade, a porção de fármaco maitansinoide é $N^{2'}$-diacetil-$N^{2'}$-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (também conhecida como DM4). DM4 é representado pela seguinte fórmula estrutural.



DM4

[00124] A porção de fármaco D pode estar ligada ao anticorpo Ab através do ligante L. L é qualquer porção química capaz de ligar a porção de fármaco ao anticorpo através de ligações covalentes. Um reagente de reticulação é um reagente bifuncional ou multifuncional que pode ser usado para ligar uma porção de fármaco e um anticorpo para formar conjugados de anticorpo e fármaco. Conjugados de anticorpo e fármaco podem ser preparados usando um reagente de reticulação possuindo uma funcionalidade reativa capaz de se ligar tanto à porção de fármaco como ao anticorpo. Por exemplo, uma cisteína, tiol ou uma amina, por exemplo, um terminal N ou cadeia lateral de aminoácido, tal como lisina do anticorpo, podem formar uma ligação com um grupo funcional de um reagente de reticulação. Em alternativa, os conjugados de anticorpo e fármaco podem ser preparados pré-formando uma porção de ligante-fármaco (ou porção de fármaco-ligante, ambos os termos podem ser usados indistintamente) e reagindo a porção de ligante-fármaco com o anticorpo. Em alguns casos, a porção de ligante é construída no fármaco gradualmente usando várias porções de ligação até obter a desejada porção de ligante-fármaco.

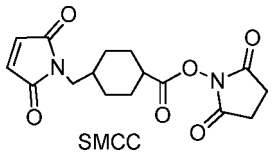
[00125] Em uma modalidade, L é um ligante clivável. Em outra modalidade, L é um ligante não clivável. Em certas modalidades, L é um

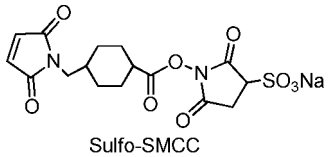
ligante lábil a ácido, ligante fotolábil, ligante clivável por peptidase, ligante clivável por esterase, ligante clivável por ligação de dissulfeto, ligante hidrofílico, ligante procarregado, ligante clivável por glicosidase, ligante clivável por fosfodiesterase, ligante clivável por fosfatase ou um ligante à base de ácido dicarboxílico.

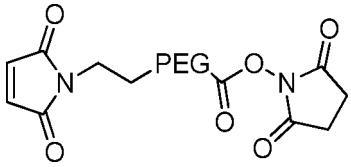
[00126] Reagentes de reticulação adequados que formam um ligante não clivável entre a porção de fármaco, por exemplo, maitansinoide, e o anticorpo, são bem conhecidos na técnica, e podem formar ligantes não cliváveis que compreendem um átomo de enxofre (tal como SMCC) ou aqueles que não possuem um átomo de enxofre. Reagentes de reticulação preferenciais que formam ligantes não cliváveis entre a porção de fármaco, por exemplo, maitansinoide, e o anticorpo, compreendem uma porção à base de maleimido ou haloacetila. De acordo com a presente invenção, tais ligantes não cliváveis são considerados derivados de porções à base de maleimido ou haloacetila.

[00127] Reagentes de reticulação compreendendo uma porção à base de maleimido incluem, mas não se limitam a, *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclo-hexanocarboxilato (SMCC), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC), *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclo-hexano-1-carbóxi-(6-amidocaproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster de *N*-succinimidila do ácido κ-maleimidoundeconoico (KMUA), éster de *N*-succinimidila do ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de *N*-succinimidila do ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMSA), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(-p-maleimidofenil)isocianato (PMIP) e reagentes de reticulação à base de maleimido contendo um espaçador de polietilenoglicol, tal como MAL-PEG-NHS. Estes reagentes de reticulação formam ligantes não

cliváveis derivados de porções à base de maleimido. Abaixo são mostradas estruturas representativas de reagentes de reticulação à base de maleimido.

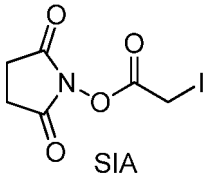

SMCC


Sulfo-SMCC

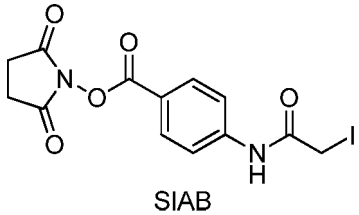

MAL-PEG-NHS

[00128] Em outra modalidade, o ligante L é derivado de *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclo-hexanocarboxilato (SMCC), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC) ou MAL-PEG-NHS.

[00129] Reagentes de reticulação compreendendo uma porção à base de haloacetila incluem iodoacetato de N-succinimidila (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), bromoacetato de N-succinimidila (SBA) e 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidila (SBAP). Estes reagentes de reticulação formam um ligante não clivável derivado de porções à base de haloacetila. Abaixo são mostradas estruturas representativas de reagentes de reticulação à base de haloacetila.


SIA

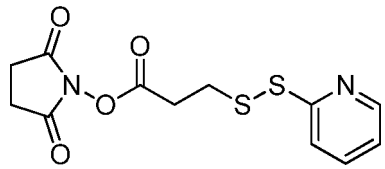
ou


SIAB

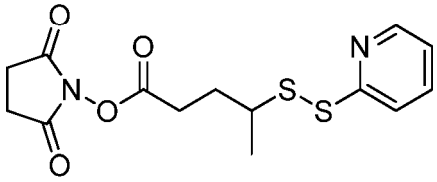
[00130] Em uma modalidade, o ligante L é derivado de iodoacetato de N-succinimidila (SIA) ou N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato

(SIAB).

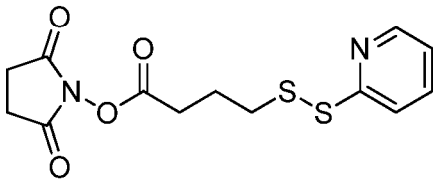
[00131] Reagentes de reticulação adequados que formam um ligante clivável entre a porção de fármaco, por exemplo, maitansinoide, e o anticorpo, são bem conhecidos da técnica. Ligantes contendo dissulfeto são ligantes cliváveis por meio de troca de dissulfeto, a qual pode ocorrer sob condições fisiológicas. De acordo com a presente invenção, tais ligantes cliváveis são considerados derivados de porções à base de dissulfeto. Reagentes de reticulação de dissulfeto adequados incluem N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) e *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), cujas estruturas são mostradas abaixo. Estes reagentes de reticulação de dissulfeto formam um ligante clivável derivado de porções à base de dissulfeto.



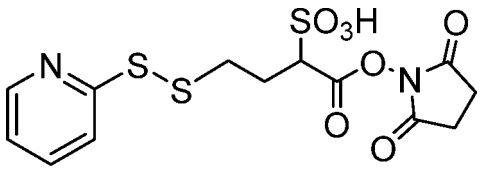
N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP),



N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP),



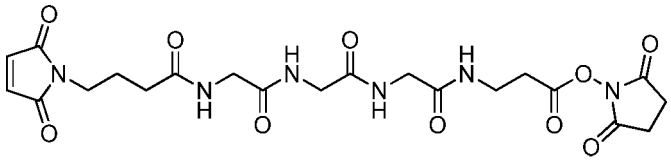
N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) e



N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

[00132] Em uma modalidade, o ligante L é derivado de butanoato de N-succinimidil-4-(2-piridilditio) (SPDB).

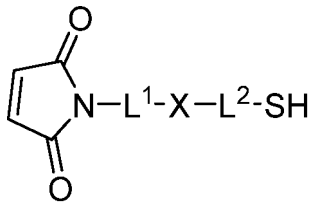
[00133] Reagentes de reticulação adequados que formam um ligante carregado entre a porção de fármaco, por exemplo, maitansinoide, e o anticorpo, são conhecidos como reagentes de reticulação procarregados. Em uma modalidade, o ligante L é derivado do reagente de reticulação procarregado CX1-1. A estrutura de CX1-1 é mostrada abaixo.



17-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetra-aza-heptadecan-1-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (CX1-1)

[00134] Cada um dos reagentes de reticulação descritos acima contém, em uma extremidade do reagente de reticulação, um éster NHS que reage com uma amina primária do anticorpo para formar uma ligação amida, na outra extremidade, um grupo maleimida ou grupo piridinildissulfeto que reage com a sulfidrila da porção de fármaco maitansinoide para formar uma ligação tioéter ou dissulfeto.

[00135] Em outra modalidade, porções de reticulação adequadas que formam um ligante clivável entre a porção de fármaco (por exemplo, maitansinoide), e o anticorpo, são representados pela seguinte fórmula (II):



(II);

em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

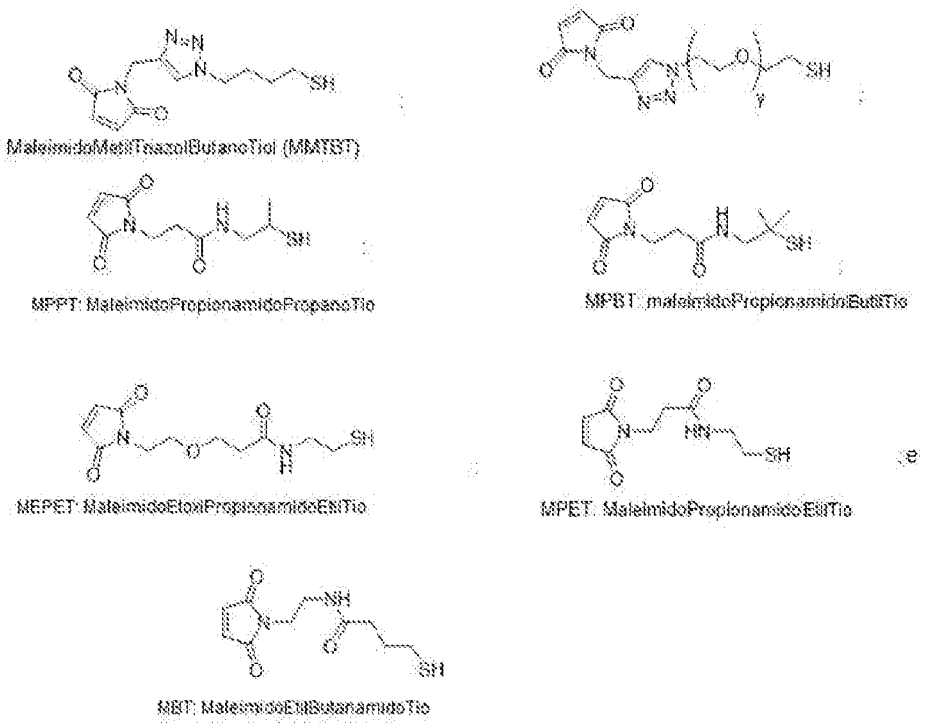
L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado.

[00136] Em um aspecto desta modalidade, y é 5, 7, 9 ou 11. Em outro aspecto desta modalidade, y é inferior a 5.

[00137] Ainda em outra modalidade, porções de reticulação adequadas de acordo com a fórmula I são selecionadas a partir do grupo consistindo em:

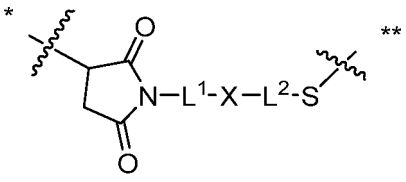


;

em que y é 1 a 11.

[00138] Para as porções de reticulação descritas acima (ou seja, MBT, MPET, MEPET; MMTBT, MPPT, MPBT), o grupo maleimida permite a reação com a sulfidrila (ou tiol) de uma Cisteína em um anticorpo, formando assim uma ligação tioéter; e a funcionalidade tiol da porção de reticulação é ligada ao tiol da porção de fármaco maitansinoide para formar uma ligação de dissulfeto clivável. Tendo em conta a natureza de reatividade cruzada da porção de ligação de Fórmula (I) (o tiol e a maleimida poderiam apresentar reatividade cruzada), um entendido na técnica apreciaria que a porção de ligação tem de ser construída gradualmente na porção de fármaco, como mostrado no Esquema 1.

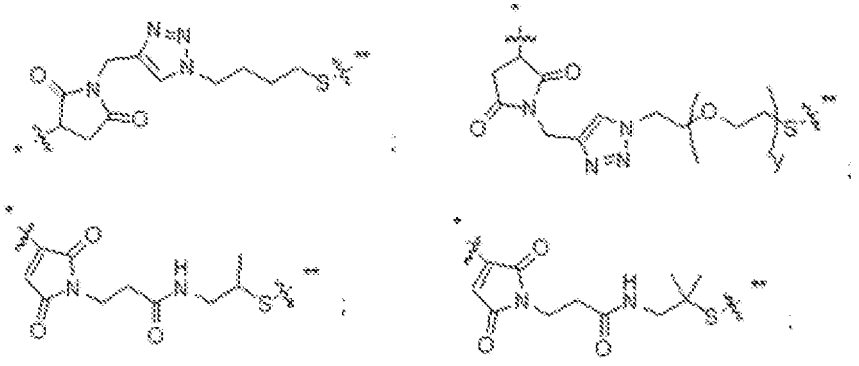
[00139] De acordo com a modalidade acima, os ligantes que resultam das porções de reticulação (ou seja, MBT, MPET, MEPET) podem ser representados da seguinte forma:

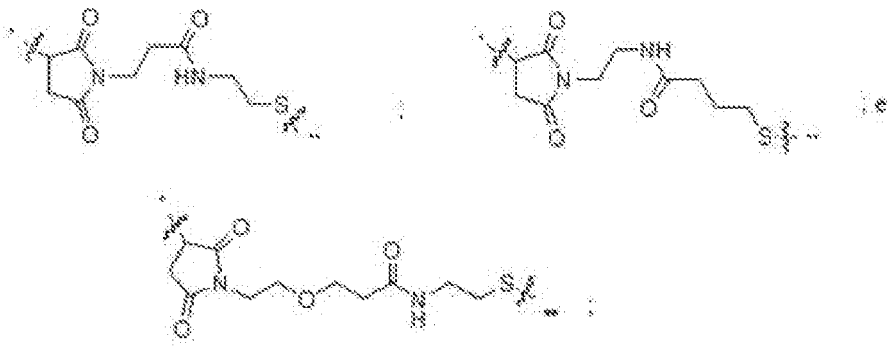


(IIA);

em que * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol de uma porção de fármaco (por exemplo, porção de fármaco maitansinoide DM1, DM3 ou DM4).

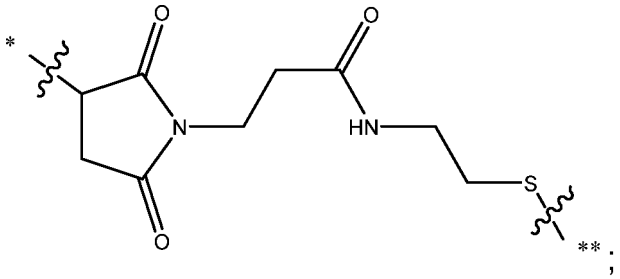
[00140] De acordo com a modalidade acima, os ligantes que resultam das porções de reticulação (ou seja, MBT, MPET, MEPET) podem ser representadas da seguinte forma:





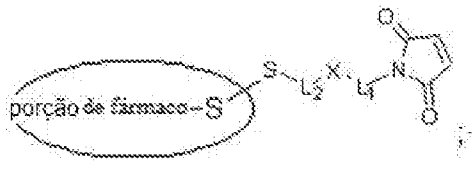
em que y é 1 a 11; * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol da porção de fármaco (por exemplo, fármaco maitansinoide DM1, DM3 ou DM4).

[00141] Em outra modalidade preferencial, o ligante tem a seguinte fórmula:



em que * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol do fármaco maitansinoide (DM1, DM3 ou DM4).

[00142] Em uma modalidade, a invenção refere-se à porção de ligante-fármaco de Fórmula:



em que

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

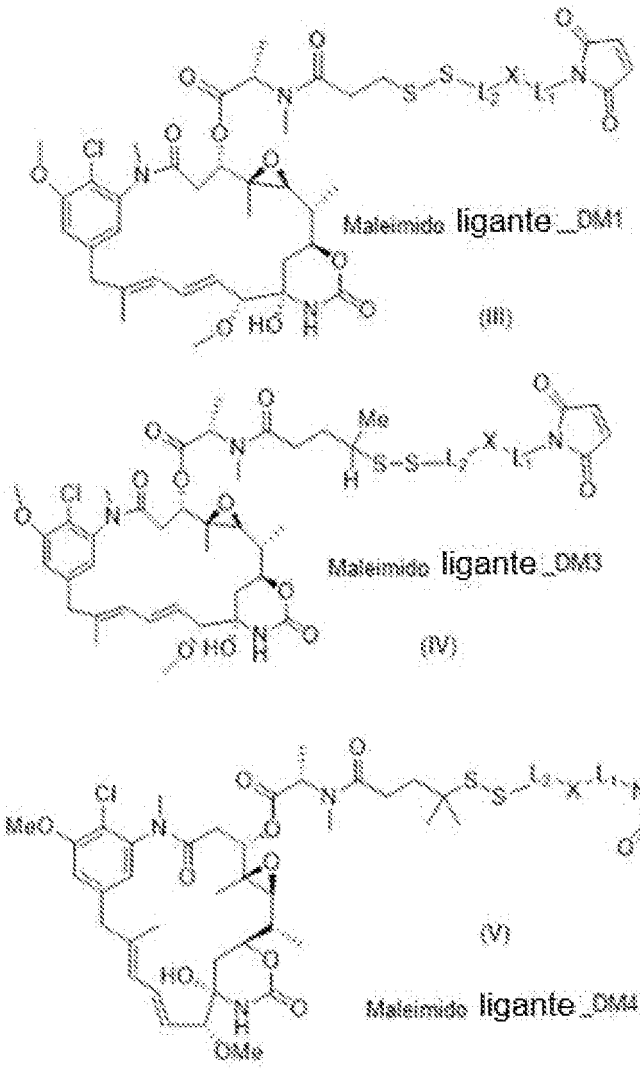
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado.

[00143] Em outra modalidade, a invenção pertence à formação gra-

dual do conjugado de ligante-fármaco acima, como divulgado aqui no Esquema 1.

[00144] Em uma modalidade, a invenção refere-se aos compostos de porção de ligante-fármaco possuindo uma das seguintes Fórmulas (III), (IV) e (V):



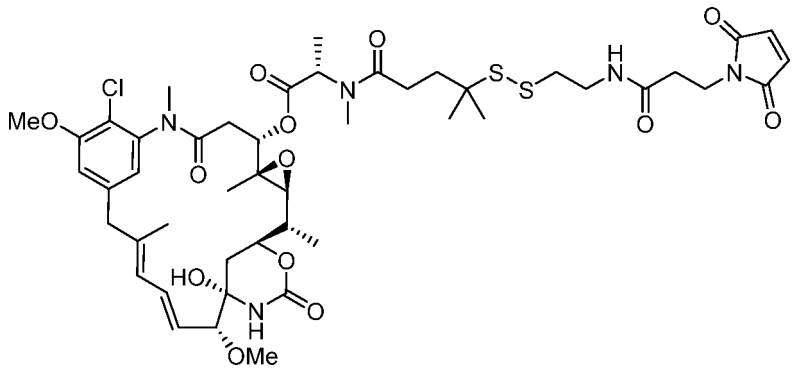
em que L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

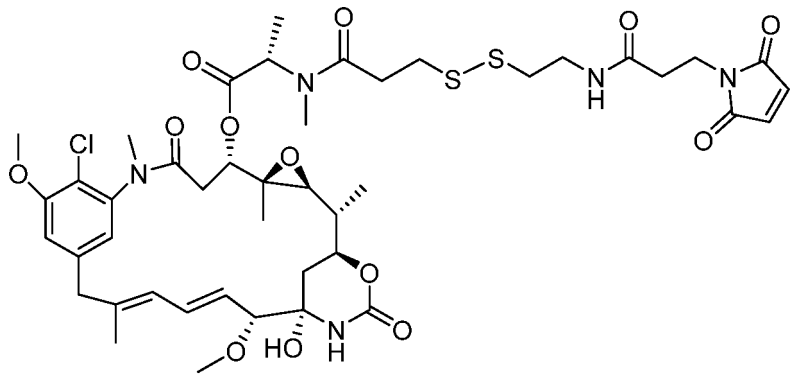
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado.

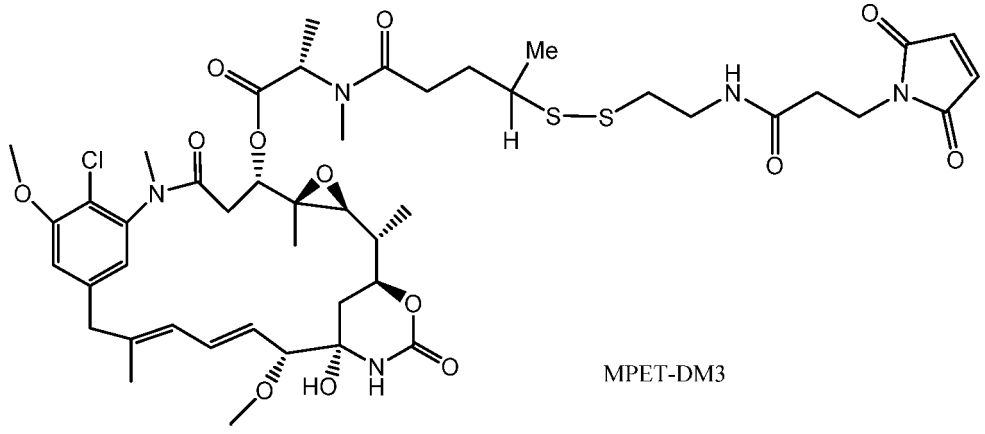
[00145] Em uma modalidade, a invenção refere-se aos compostos de porção de ligante-fármaco que são selecionados de entre as seguintes fórmulas:



MPET-DM4 ;

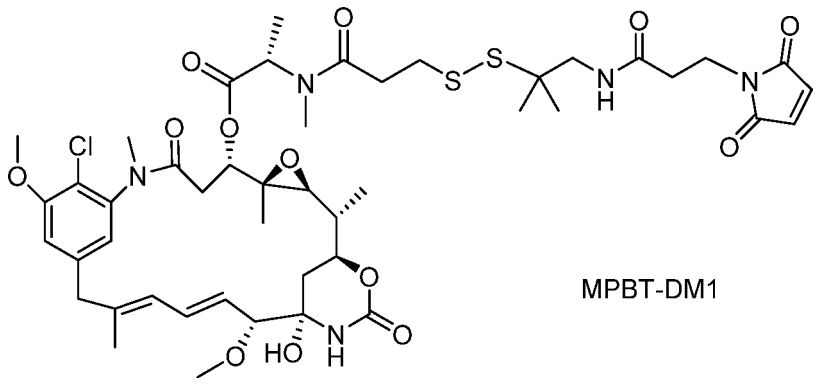


MPET-DM1 ;



MPET-DM3

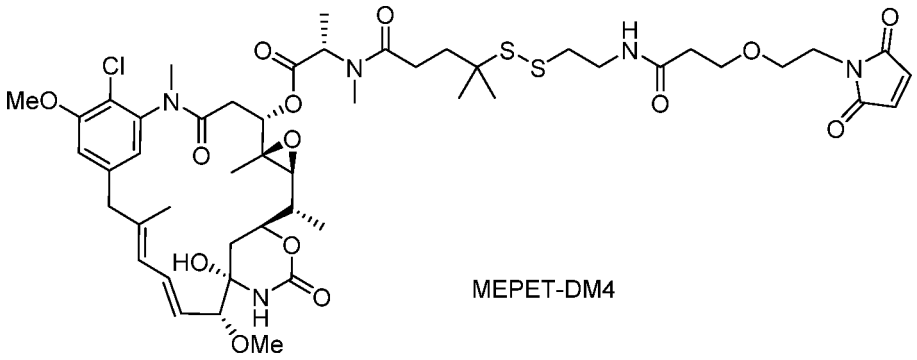
; e



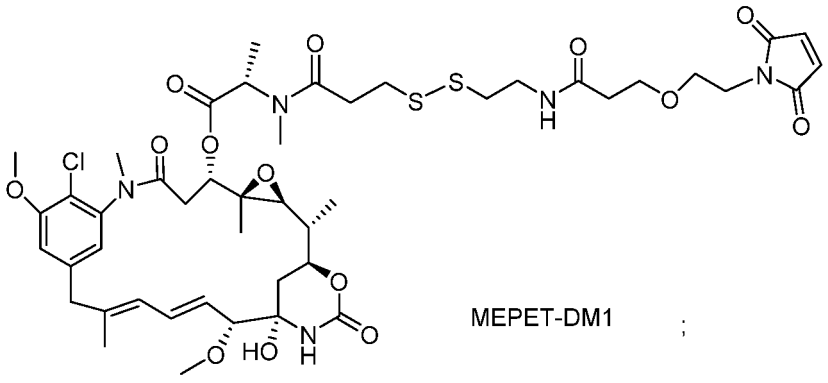
MPBT-DM1

.

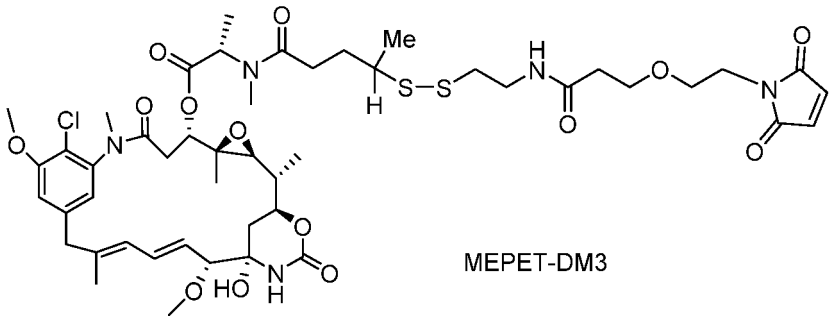
[00146] Em outra modalidade, a invenção refere-se aos compostos de porção de ligante-fármaco que são selecionados de entre as seguintes fórmulas:



MEPET-DM4 ;



MEPET-DM1 ;

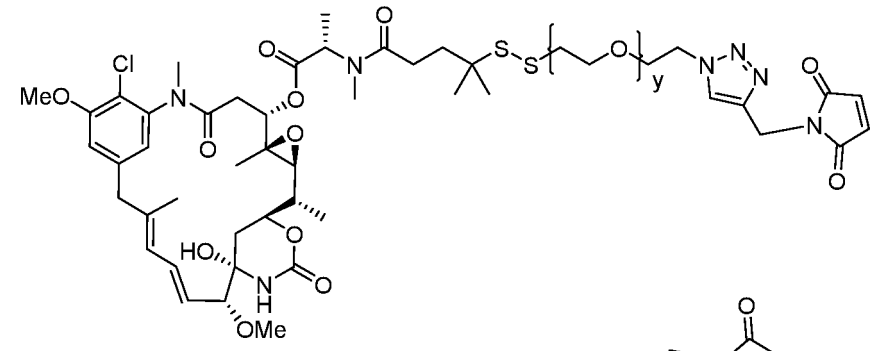


MEPET-DM3

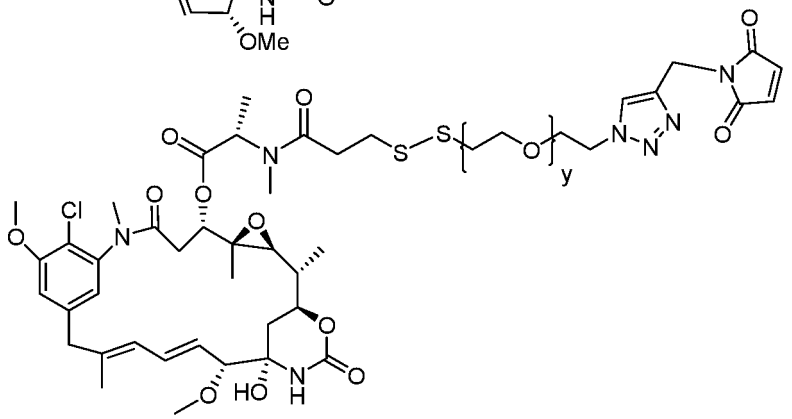
.

[00147] Em outra modalidade, o ligante-fármaco da presente inven-

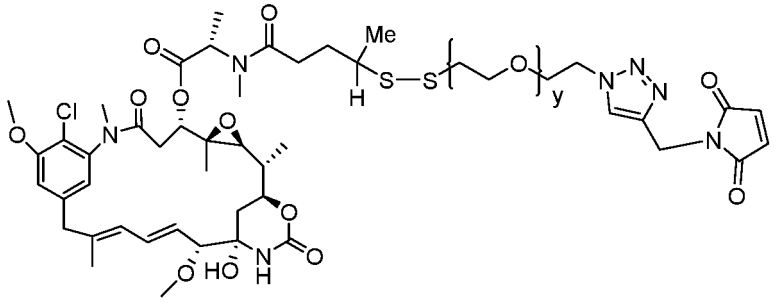
ção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



;



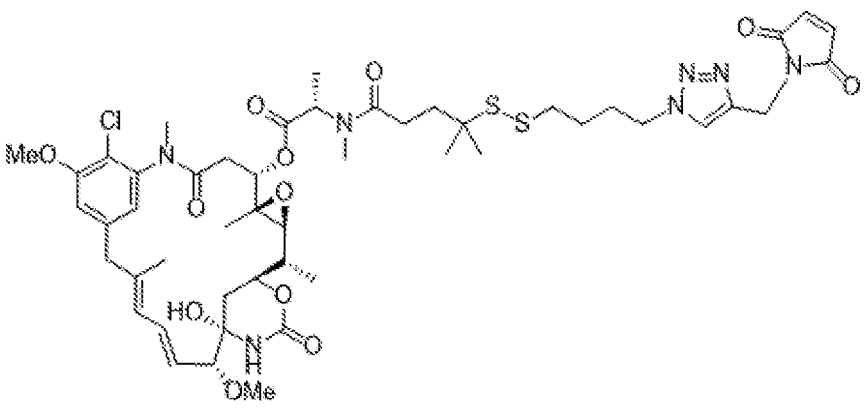
;

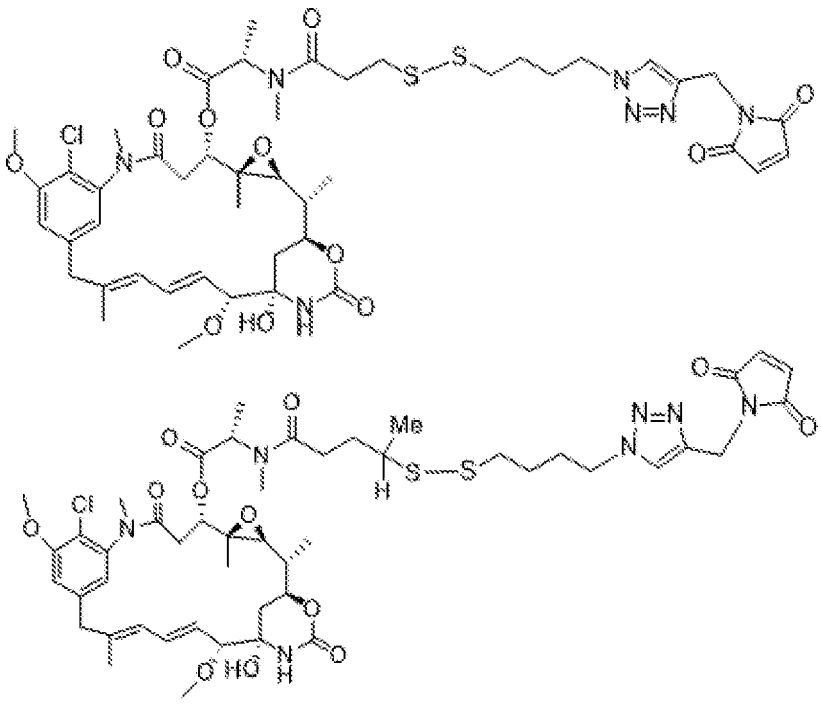


;

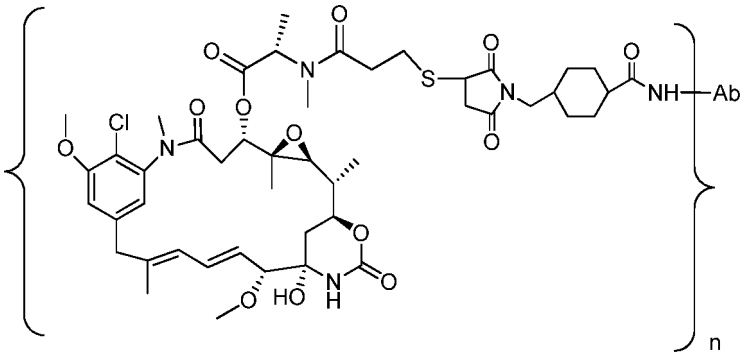
em que y é 1 a 11, de preferência 1 a 5.

[00148] Em uma modalidade, o ligante-fármaco da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas estruturais:

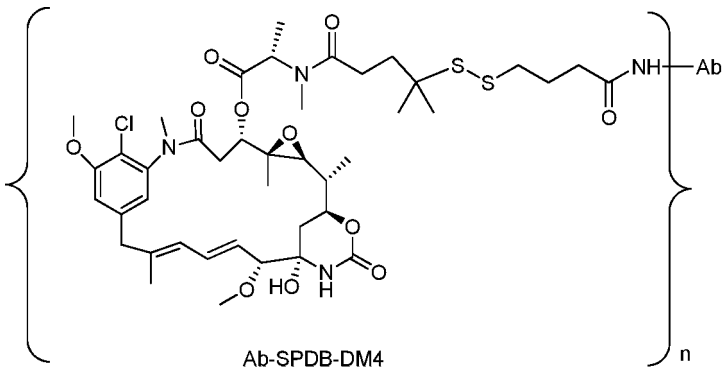




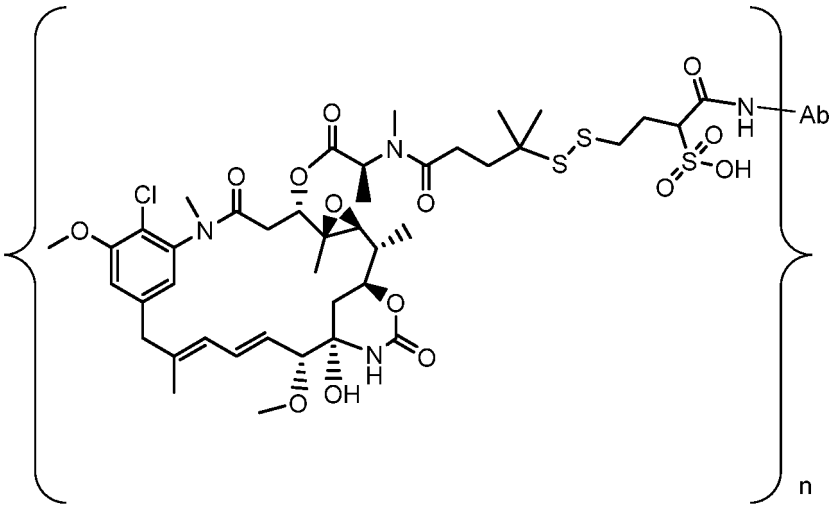
[00149] Em uma modalidade, o conjugado da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas estruturais:



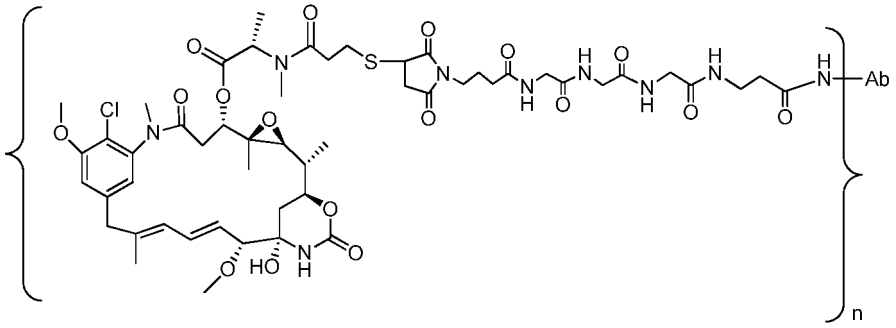
Ab-MCC-DM1



Ab-SPDB-DM4



Ab-sSPDB-DM4



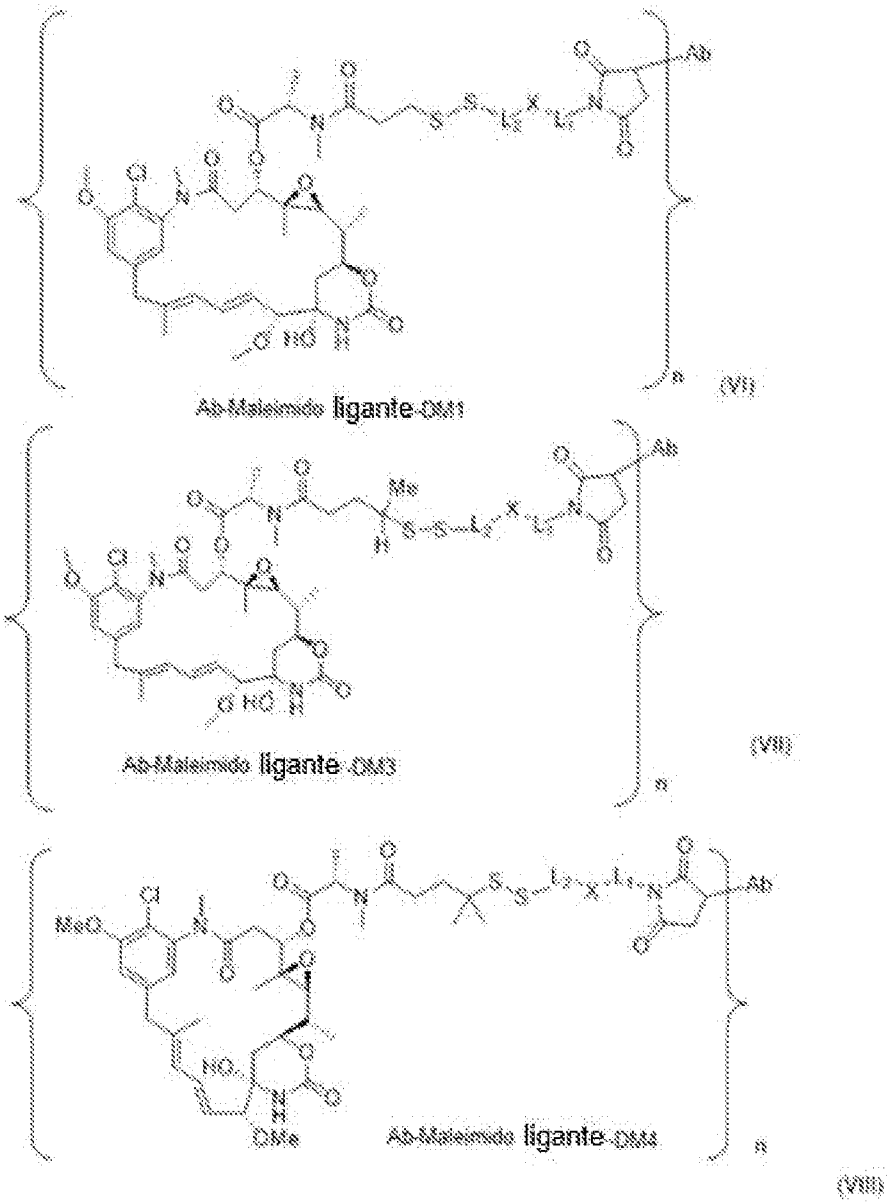
Ab-CX1-1-DM1

em que:

Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CCR7;

n, que indica o número de grupos de ligante-fármaco (L-D) ligados a Ab através da formação de uma ligação amida com uma amina primária de Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, 2 a 8 ou de 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4.

[00150] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas (VI), (VII) e (VIII):



em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

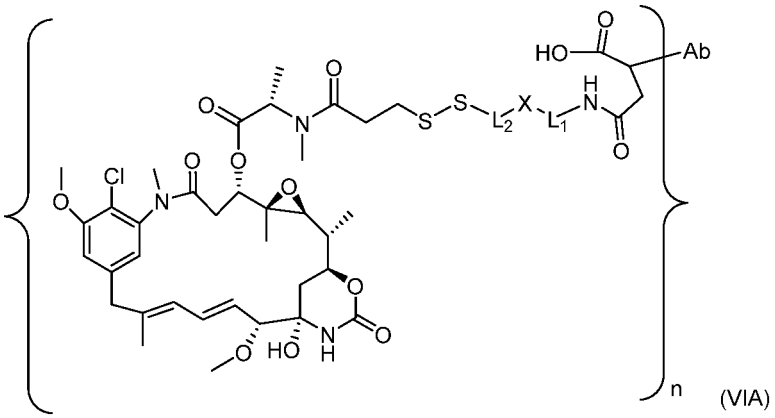
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

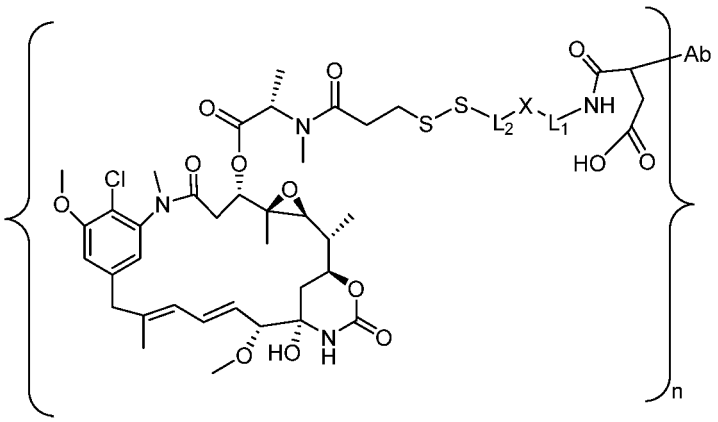
Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos de ligante-fármaco (L-D) ligados a Ab através da formação de uma ligação amida com uma amina primária de Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, de 2 a 8 ou de 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00151] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção tem a Fórmula (VIA) ou (VIB) correspondente às formas abertas da succinimida do conjugado de Fórmula (VI):



(VIA)



(VIB);

em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

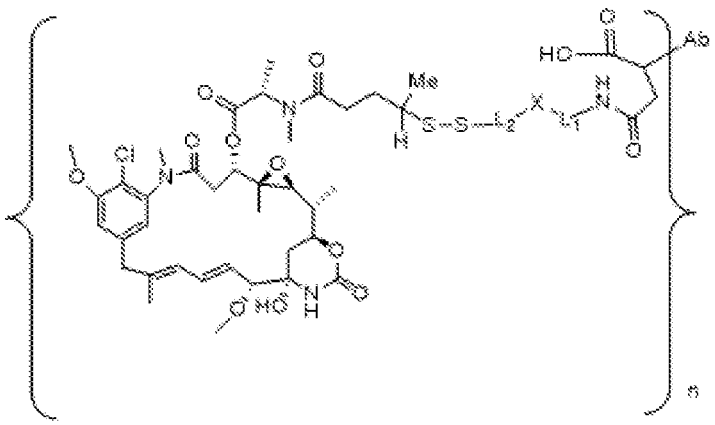
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

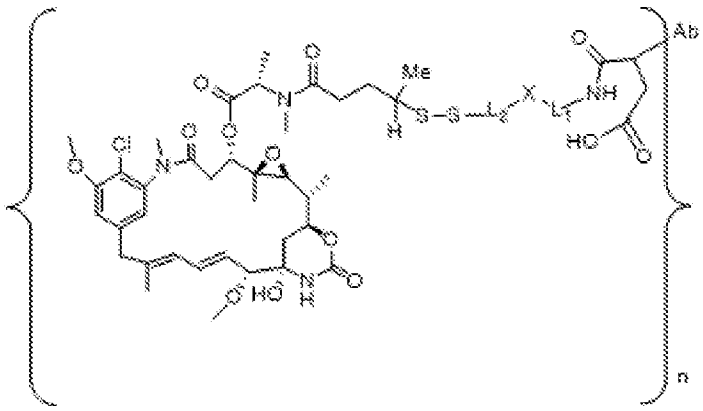
Ab é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos de ligante-fármaco (L-D) ligados a Ab através da formação de uma ligação amida com uma amina primária de Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, de 2 a 8 ou de 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00152] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção tem a Fórmula (VIIA) ou (VIIB) correspondente às formas abertas da succinimida do conjugado de Fórmula (VII):



(VIIA)



em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

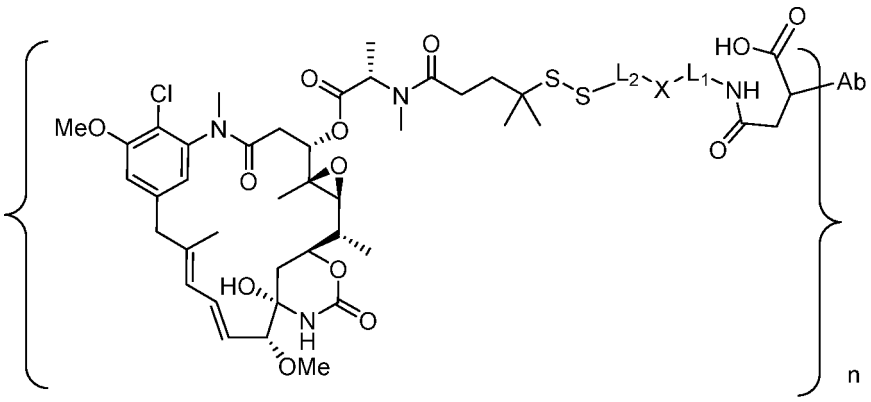
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

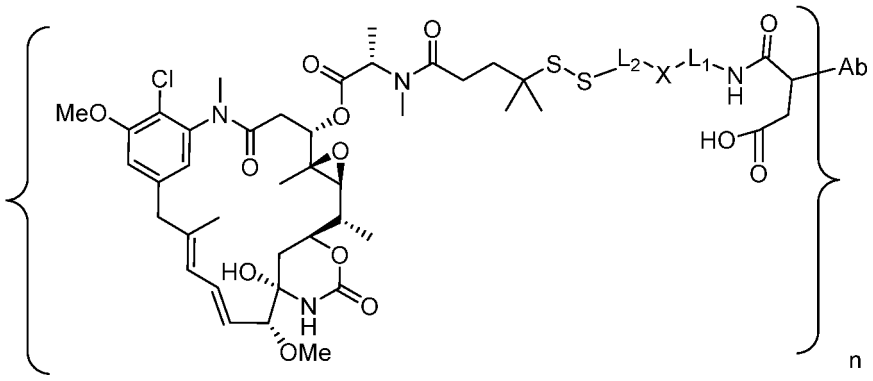
Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos de ligante-fármaco (L-D) ligados a Ab através da formação de uma ligação amida com uma amina primária de Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, de 2 a 8 ou de 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00153] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção tem a Fórmula (VIIIA), (VIIIB) correspondente às formas abertas da succinimida do conjugado de Fórmula (VIII):



(VIIIA)



(VIIIB) ;

em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

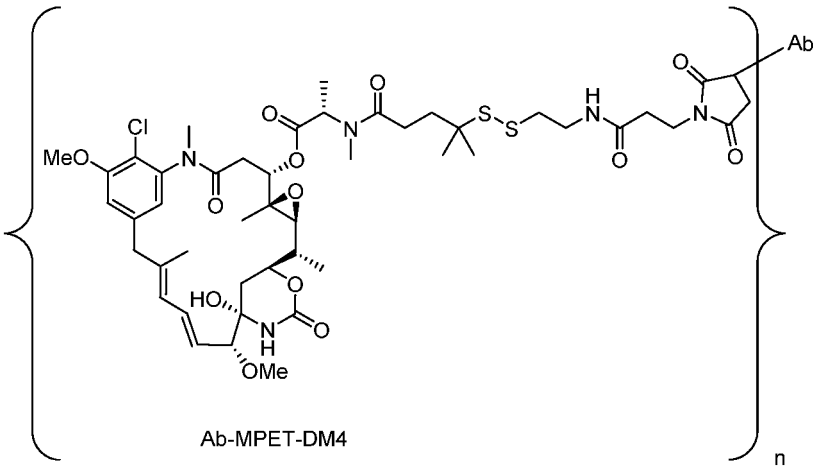
Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos de ligante-fármaco (L-D) ligados a Ab através da formação de uma ligação amida com uma amina primária de Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em uma modalidade, n é um número inteiro de 1 a 10, de 2 a 8 ou de 2 a 5. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é

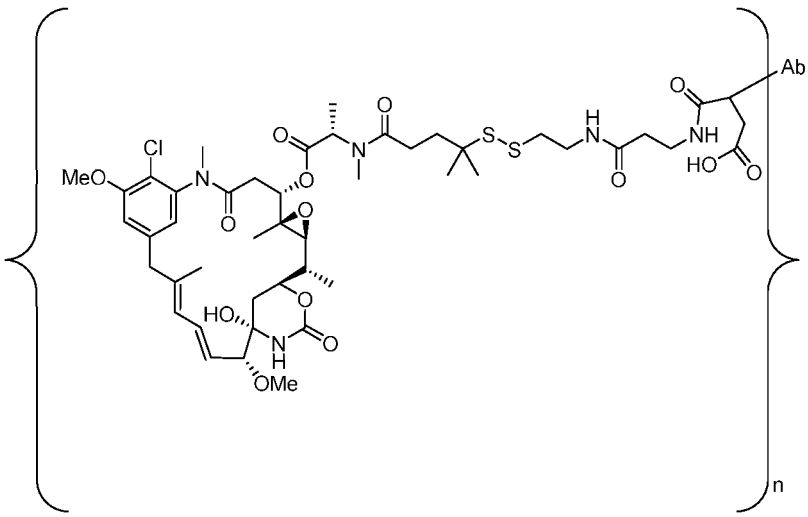
expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

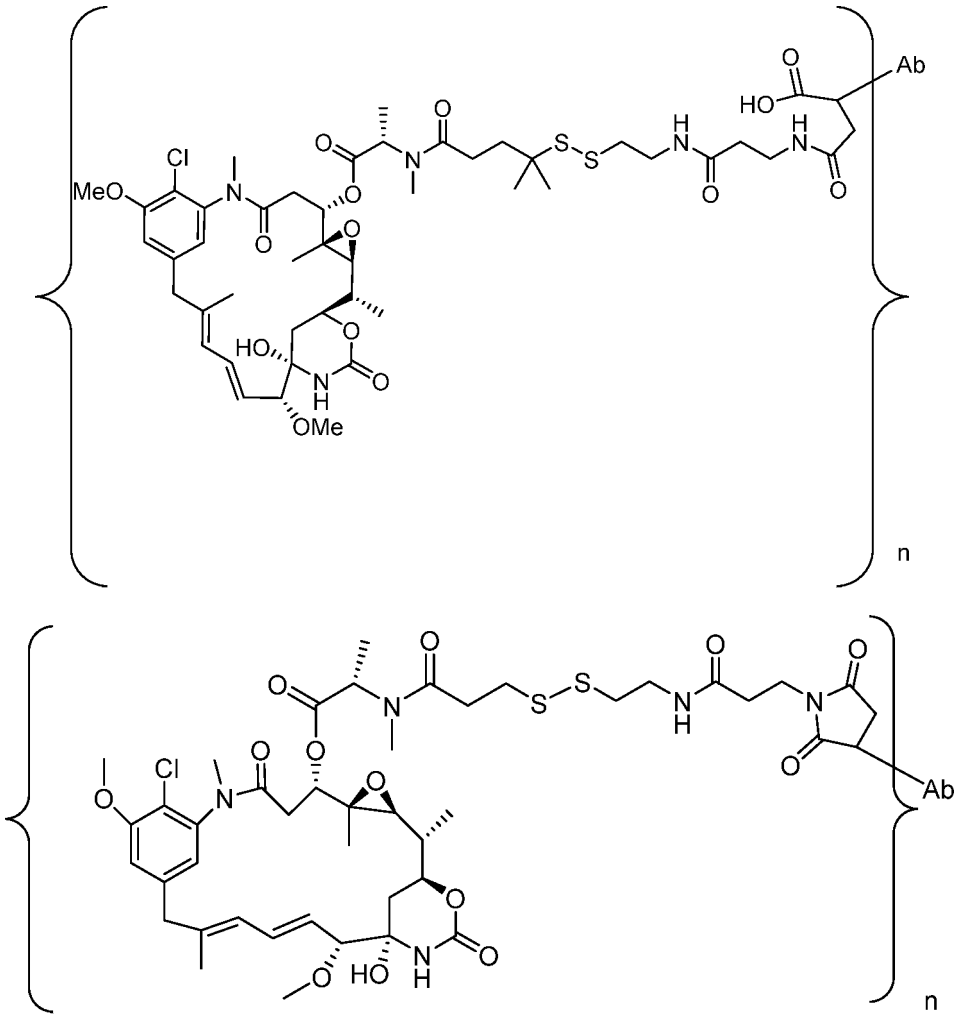
[00154] Em uma modalidade, cada conjugado de anticorpo e fármaco aqui divulgado, onde a porção de ligante-fármaco está ligada ao anticorpo por meio de uma succimida, pode também existir como as formas abertas da succinimida, como genericamente representadas nas Fórmulas (VIA), (VIB), (VIIA), (VIIB), (VIIIA) e (VIIIB).

[00155] Em ainda outra modalidade, o conjugado da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas estruturais:

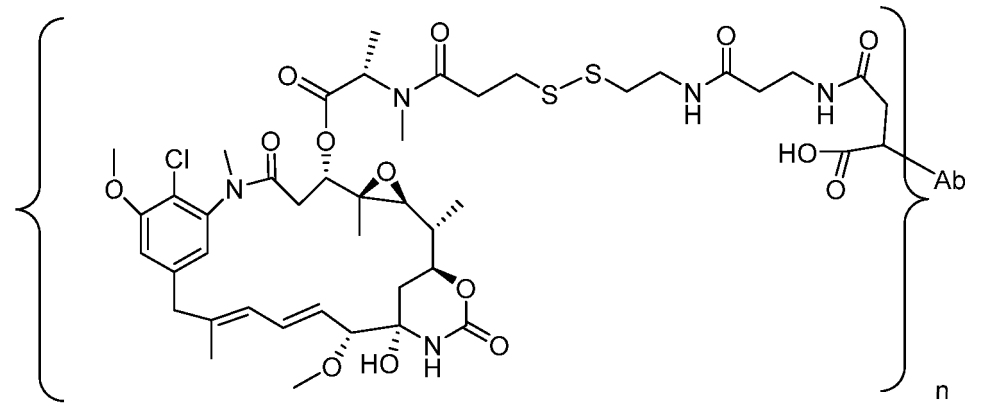


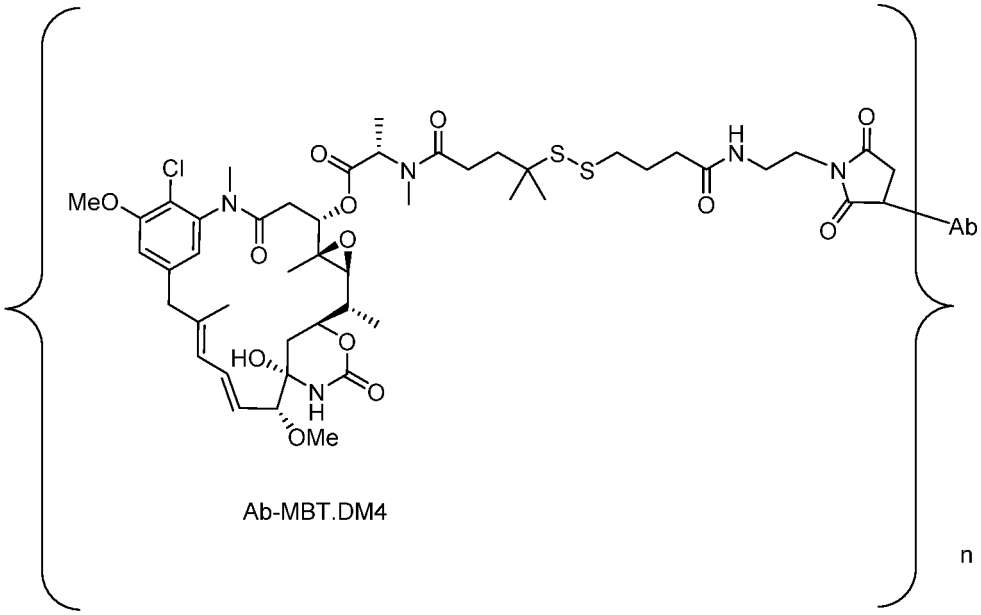
Ab-MPET-DM4



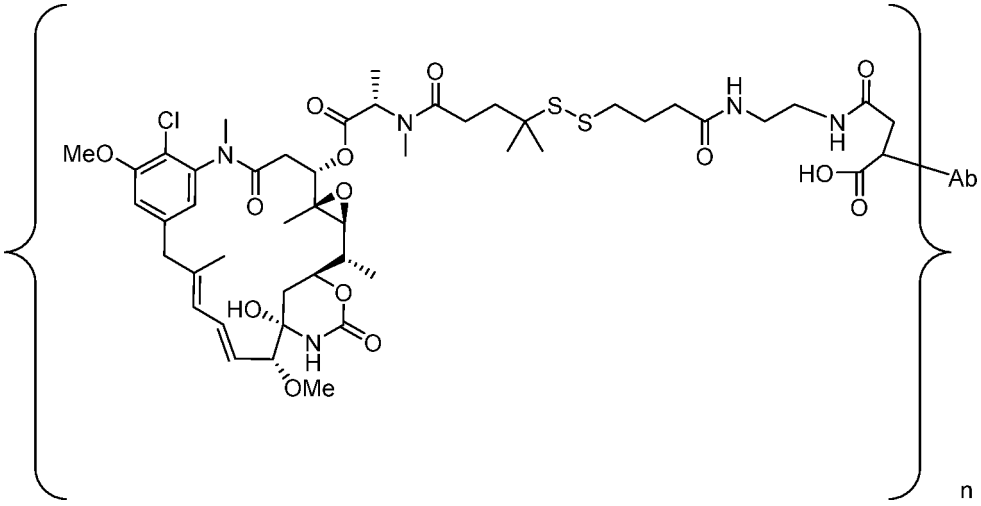


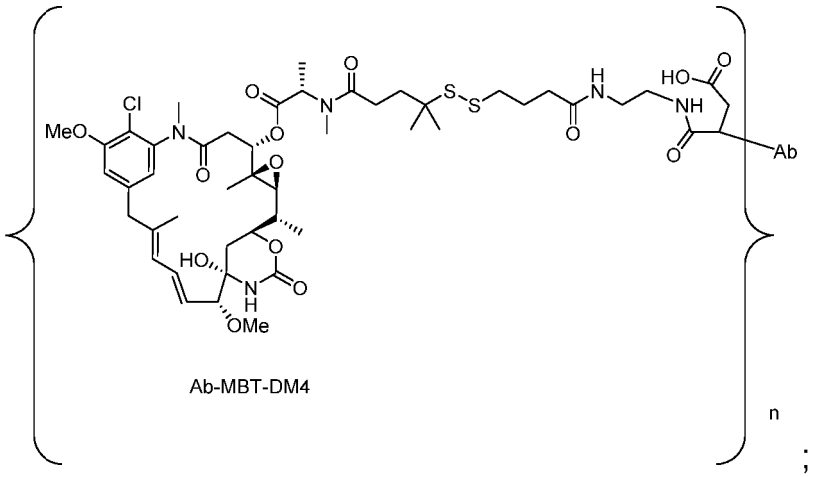
Ab-MPET-DM1


Cl
O
N
O
O
O
O
S
S
N
H
N
H
HO
O
Ab
HO
N
H
O
O
n


Cl
MeO
N
O
O
O
O
S
S
H
N
O
N
O
O
Ab
HO
N
H
O
OMe
n

Ab-MBT.DM4


Cl
MeO
N
O
O
O
O
S
S
H
N
O
N
H
HO
O
Ab
HO
N
H
O
OMe
n



Ab-MBT-DM4

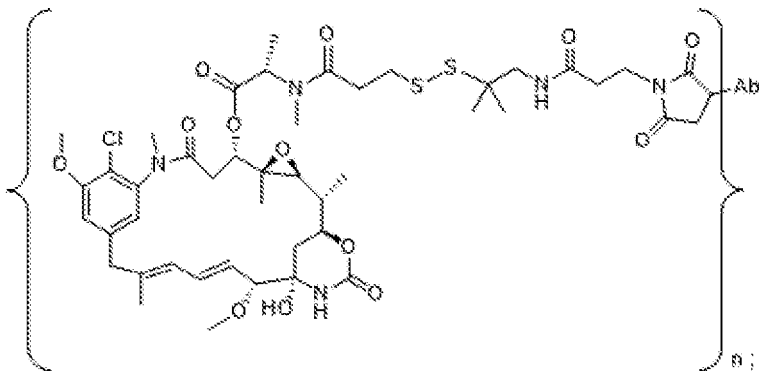
;

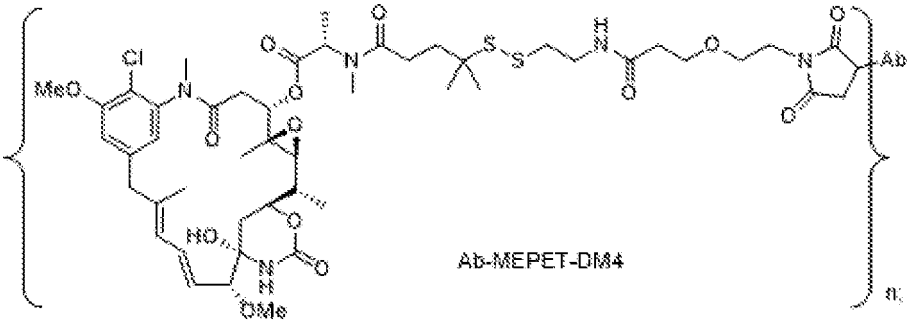
em que:

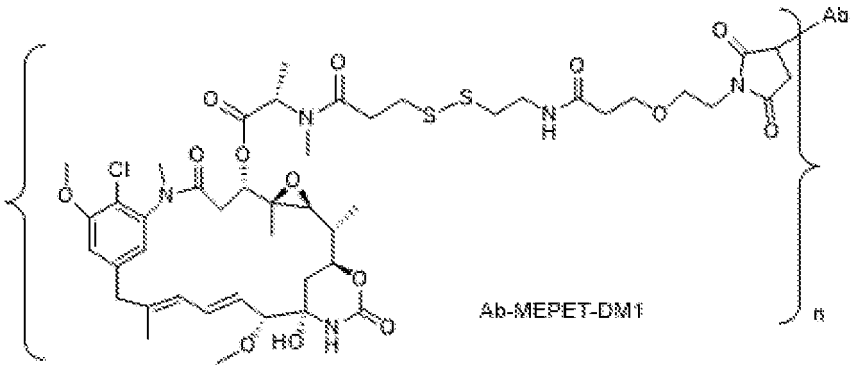
Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos D-L ligados a Ab através da formação de uma ligação tioéster com uma sulfidrila de Ab, é um número inteiro de 1 a 12, ou de 1 a 8, ou de preferência de 1 a 4. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

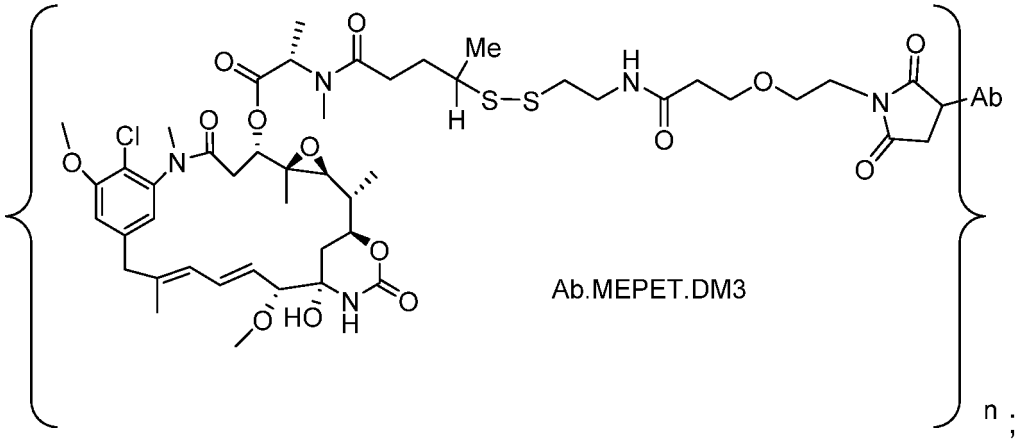
[00156] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas estruturais:







e



;

bem como as correspondentes formas abertas da succinimida;

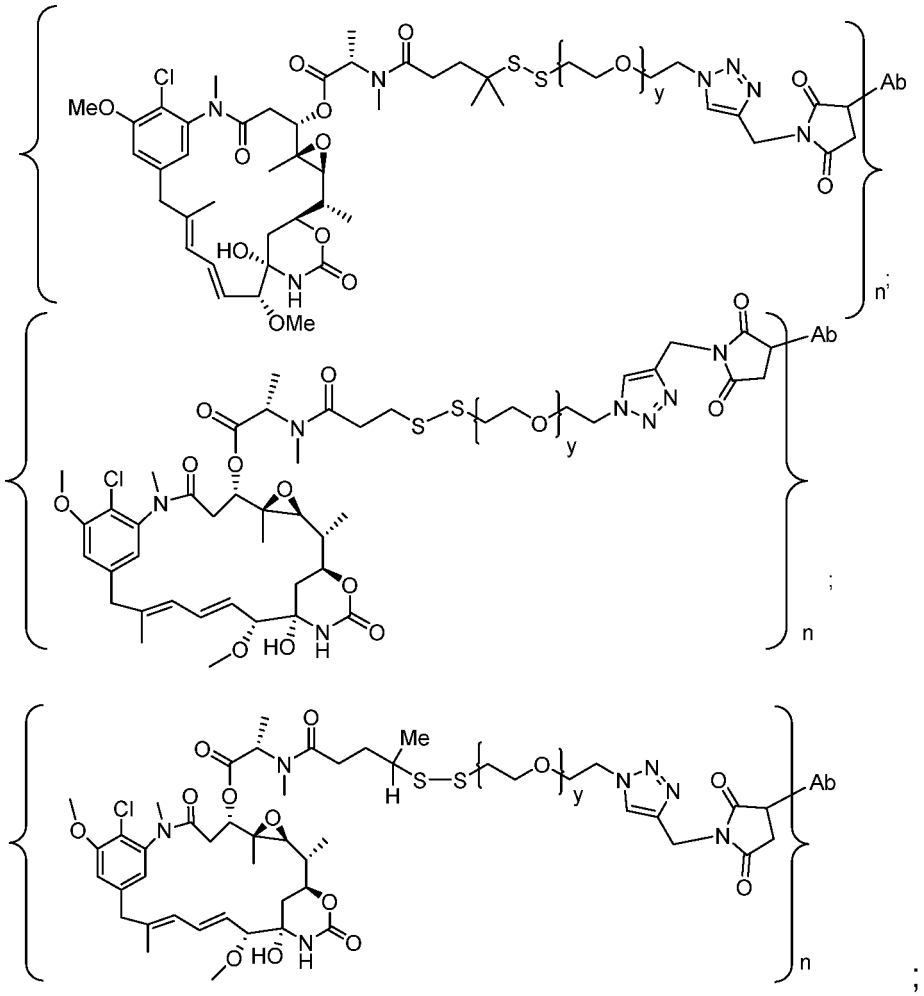
em que:

Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos D-L ligados ao Ab através da formação de uma ligação tioéster com uma sulfidrila do Ab, é um número inteiro de 1 a 12, ou de 1 a 8, ou de preferência de 1 a 4. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo

ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00157] Em outra modalidade, o conjugado da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas estruturais:



bem como as correspondentes formas abertas da succinimida;

em que:

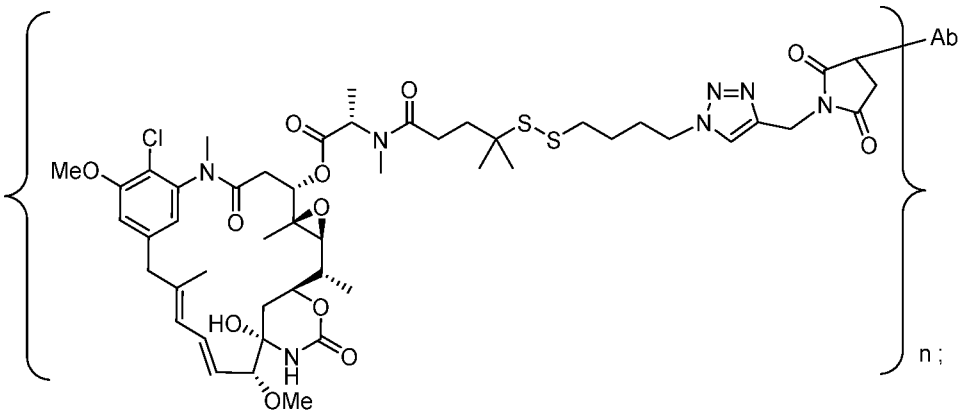
y é 1 a 11, de preferência 1 a 5;

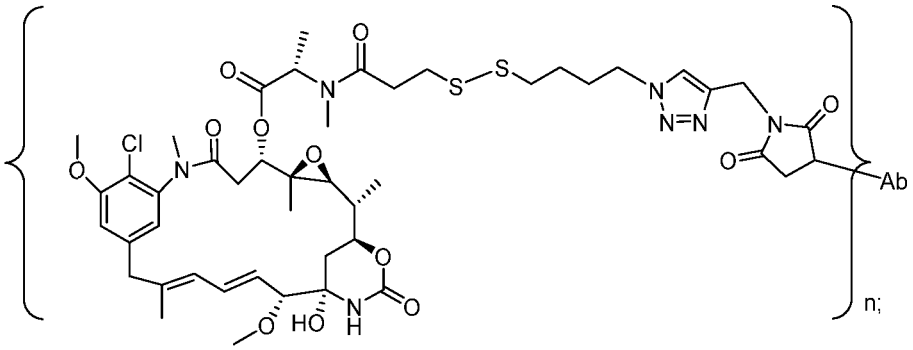
Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

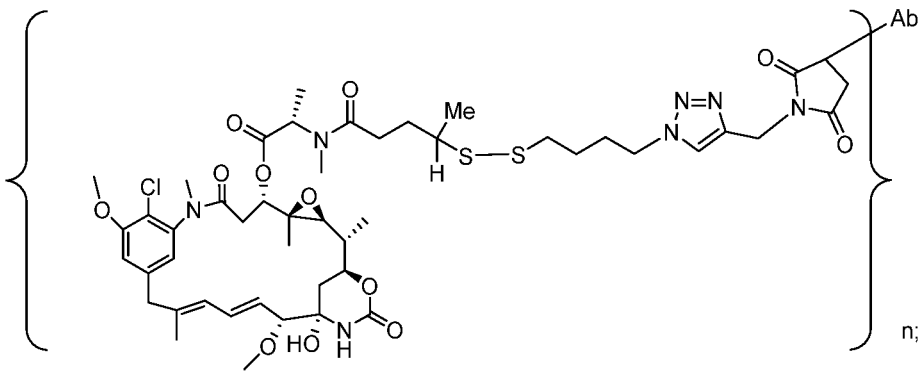
n, que indica o número de grupos D-L ligados ao Ab através da formação de uma ligação tioéster com uma sulfidrila do Ab, é um número inteiro de 1 a 12, ou de 1 a 8, ou de preferência de 1 a 4. Em

uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00158] Em ainda outra modalidade, o conjugado da presente invenção é representado pelas seguintes Fórmulas:







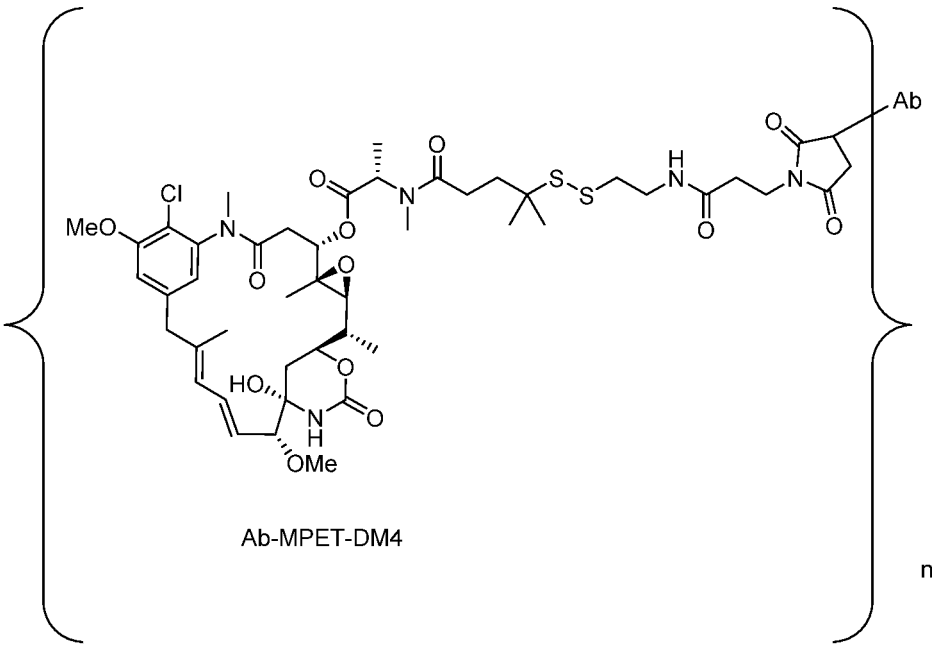
bem como as correspondentes formas abertas da succinimida;

em que:

Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos D-L ligados ao Ab através da formação de uma ligação tioéster com uma sulfidrila do Ab, é um número inteiro de 1 a 12, ou de 1 a 8, ou de preferência de 1 a 4. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00159] Em uma modalidade preferencial, o conjugado da presente invenção é representado pela seguinte Fórmula:



Ab-MPET-DM4

em que:

Ab é um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno;

n, que indica o número de grupos D-L ligados ao Ab através

da formação de uma ligação tioéster com uma sulfidrila do Ab, é um número inteiro de 1 a 20. Em certas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 12. Em certas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 8. Em certas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 4. Em uma modalidade específica, n é 3 ou 4. Em outra modalidade, o valor n médio é cerca de 3 a cerca de 4. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno que é expresso em células tumorais. Em uma modalidade, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a CCR7. Em outras modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a P-caderina, Caderina 6, FGFR2 ou FGFR4.

[00160] Em uma modalidade, a razão molar média de fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) para o anticorpo no conjugado (ou seja, valor n médio, também conhecido como Razão de Anticorpo Maitansinoide (MAR)) é de cerca de 1 a cerca de 10, cerca de 2 a cerca de 8 (por exemplo, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, ou 8,1), cerca de 2,5 a cerca de 7, cerca de 3 a cerca de 5, cerca de 2,5 a cerca de 4,5 (por exemplo, cerca de 2,5, cerca de 2,6, cerca de 2,7, cerca de 2,8, cerca de 2,9, cerca de 3,0, cerca de 3,1, cerca de 3,3, cerca de 3,4, cerca de 3,5, cerca de 3,6, cerca de 3,7, cerca de 3,8, cerca de 3,9, cerca de 4,0, cerca de 4,1, cerca de 4,2, cerca de 4,3, cerca de 4,4, cerca de 4,5), cerca de 3,0 a cerca de 4,0, cerca de 3,2 a cerca de 4,2 ou cerca de 4,5 a 5,5 (por exemplo, cerca de 4,5, cerca de 4,6, cerca de 4,7, cerca de 4,8, cerca de 4,9, cerca de 5,0, cerca de 5,1, cerca de 5,2, cerca de 5,3, cerca de 5,4 ou cerca de 5,5).

[00161] Em um aspecto da invenção, o conjugado da presente in-

venção tem pureza substancialmente alta e tem uma ou mais das seguintes características: (a) mais do que cerca de 90% (por exemplo, mais do que ou igual a cerca de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%), de preferência mais do que cerca de 95%, de espécies de conjugados são monoméricas, (b) o nível de ligante não conjugado na preparação de conjugado é inferior a cerca de 10% (por exemplo, inferior ou igual a cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0%) (relativamente ao ligante total), (c) menos de 10% de espécies de conjugados são reticuladas (por exemplo, menos do que ou igual a cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0%), (d) o nível de fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) na preparação de conjugado é inferior a cerca de 2% (por exemplo, inferior ou igual a 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, ou 0%) (mol/mol em relação ao agente citotóxico total) e/ou (e) não ocorre aumento substancial no nível de fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) no armazenamento (por exemplo, após cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses, cerca de 1 ano, cerca de 2 anos, cerca de 3 anos, cerca de 4 anos ou cerca de 5 anos). "Aumento substancial" no nível de fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) significa que após um certo tempo de armazenamento (por exemplo, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses, cerca de 1 ano, cerca de 2 anos, cerca de 3 anos, cerca de 4 anos ou cerca de 5 anos), o aumento no nível de fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) é inferior a cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1,0%, cerca de 1,1%,

cerca de 1,2%, cerca de 1,3%, cerca de 1,4%, cerca de 1,5%, cerca de 1,6%, cerca de 1,7%, cerca de 1,8%, cerca de 1,9%, cerca de 2,0%, cerca de 2,2%, cerca de 2,5%, cerca de 2,7%, cerca de 3,0%, cerca de 3,2%, cerca de 3,5%, cerca de 3,7% ou cerca de 4,0%.

[00162] Como usada aqui, a expressão “ligante não conjugado” refere-se ao anticorpo que é ligado covalentemente a um ligante derivado de um reagente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1), em que o anticorpo não está covalentemente acoplado ao fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) através de um ligante (ou seja, o "ligante não conjugado" pode ser representado por Ab-MCC, Ab-SPDB ou Ab-CX1-1).

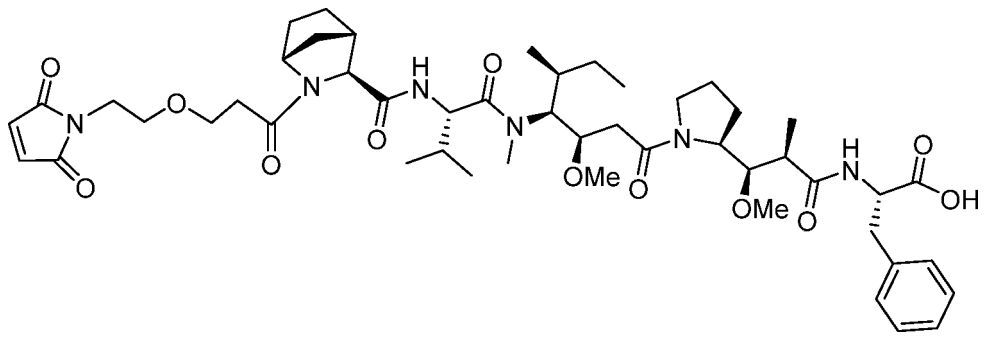
1. Porção de Fármaco

[00163] A presente invenção fornece imunoconjugados que se ligam especificamente a CCR7. Os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção compreendem anticorpos anti-CCR7, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais que são conjugados com uma porção de fármaco, por exemplo, um agente anticancerígeno, um agente de tratamento autoimune, um agente anti-inflamatório, um agente antifúngico, um agente antibacteriano, um agente antiparasítico, um agente antiviral ou um agente anestésico. Os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da invenção podem ser conjugados com várias porções de fármaco idênticas ou diferentes usando quaisquer métodos conhecido da técnica.

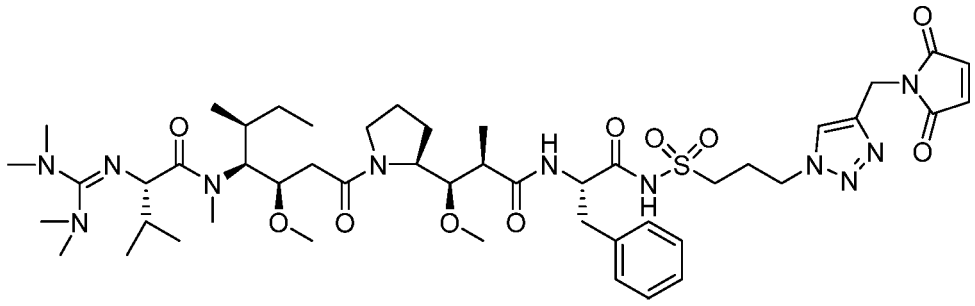
[00164] Em certas modalidades, a porção de fármaco dos imunoconjugados da presente invenção é selecionada de entre um grupo consistindo em um inibidor de V-ATPase, um agente pró-apoptótico, um inibidor de Bcl2, um inibidor de MCL1, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizante de microtúbulo, um desestabilizante de microtúbulo, um inibidor de RNA polimerase,

uma amanitina, uma pirrolobenzodiazepina, uma auristatina, uma dolastatina, um maitansinoide, uma MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, um inibidor de Eg5, inibidores de proteassomos, um inibidor de reações de transferência de fosforila em mitocôndrias, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de quinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de quinesina, um inibidor de HDAC, um agente de danificação de DNA, um agente alquilante de DNA, um intercalante de DNA, um aglutinante de sulco menor de DNA e um inibidor de DHFR.

[00165] Em certas modalidades, a porção de fármaco dos imunoconjugados da presente invenção é uma auristatina divulgada nos Pedidos PCT Número: WO 2015/095301 e WO2015/189791, ambos os pedidos são incorporados aqui por referência. Exemplos não limitativos de construtos de porção de fármaco auristatina-ligante são:



(que é AURIX2 como divulgado no presente pedido); e



(que é AURIX1 como divulgado no presente pedido);

[00166] Em uma modalidade, a porção de fármaco dos imunoconjugados da presente invenção é uma porção de fármaco maitansinoi-

de, tal como, mas não se limitando a, DM1, DM3 ou DM4.

[00167] Além disso, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção podem ser conjugados com uma porção de fármaco que modifica uma determinada resposta biológica. As porções de fármaco não devem ser entendidas como limitadas a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas incluem, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, toxina da cólera ou toxina da difteria, uma proteína tal como fator de necrose tumoral, interferon α, interferon β, fator de crescimento dos nervos, fator de crescimento plaquetário, ativador do plasminogênio em tecidos, uma citoquina, um agente apoptótico, um agente antiangiogênico ou um modificador de resposta biológica tal como, por exemplo, uma linfoquina.

[00168] Em uma modalidade, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção são conjugados com uma porção de fármaco, tal como citotoxina, um fármaco (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Exemplos de citotoxinas incluem, mas não se limitam a, taxanos (ver, por exemplo, os Pedidos de Patente Internacional (PCT) Nºs. WO 01/38318 e PCT/US03/02675), agentes alquilantes de DNA (por exemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, maitansinoides e agentes citotóxicos compreendendo uma porção reativa de polietilenoglicol (ver, por exemplo, Sasse *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco *et al.*, Blood (2003) (publicação eletrônica anterior à publicação impressa), Patentes U.S. Nºs. 5,475,092,

6,340,701, 6,372,738 e 6,436,931, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2001/0036923 A1, Pedido de Patente pendente U.S. com Nºs de série 10/024,290 e 10/116,053 e Pedido de Patente Internacional (PCT) Nº WO 01/49698), taxona, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, antracindiona di-hidroxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-de-hidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e seus análogos ou homólogos. Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabolitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de ablação (por exemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina, antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente conhecida como daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente conhecida como actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina). (Ver, por exemplo, Seattle Genetics US20090304721).

[00169] Outros exemplos de citotoxinas que podem ser conjugadas com os anticorpos, fragmentos de anticorpo (fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas e seus derivados.

[00170] Vários tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos com anticorpos são conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Saito *et al.*, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail *et al.*, (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091;

Senter and Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

[00171] Os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção podem também ser conjugados com um isótopo radioativo para gerar radiofármacos citotóxicos, referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados com anticorpos para uso diagnóstico ou terapêutico incluem, mas não se limitam a, iodo-131, índio-111, ítrio-90 e lutécio-177. Métodos para preparar radioimunoconjugados estão estabelecidos na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados comercialmente disponíveis incluem Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) e Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), e métodos semelhantes podem ser usados para preparar radioimunoconjugados usando os anticorpos da invenção. Em certas modalidades, o quelante macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (DOTA) que pode ser ligado ao anticorpo através de uma molécula ligante. Tais moléculas ligantes são comumente conhecidas na técnica e descritas em Denardo *et al.*, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; e Zimmerman *et al.*, (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, todos aqui incorporados por referência na sua totalidade.

[00172] Os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção podem também ser conjugados com uma proteína ou polipeptídeo heterólogos (ou seu fragmento, de preferência com um polipeptídeo de pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos) para gerar proteínas de fusão. Em particular, a invenção fornece proteínas de fusão compreendendo um fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) aqui descrito (por exemplo, um fragmento Fab,

fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento $F(ab)_2$, um domínio VH, uma CDR VH, um domínio VL ou uma CDR VL) e uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo heterólogos.

[00173] Proteínas de fusão adicionais podem ser geradas através de técnicas de embaralhamento de genes, embaralhamento de motivos, embaralhamento de éxons e/ou embaralhamento de códons (coletivamente referido como "embaralhamento de DNA"). O embaralhamento de DNA pode ser usado para alterar as atividades de anticorpos da invenção ou seus fragmentos (por exemplo, anticorpos ou seus fragmentos com afinidades mais elevadas e menores taxas de dissociação). Ver, genericamente, as patentes U.S. Nº 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252 e 5,837,458; Patten *et al.*, (1997) Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76; e Lorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308- 313 (todas estas patentes e pedidos são incorporados aqui por referência na sua totalidade). Anticorpos ou seus fragmentos, ou os anticorpos codificados ou seus fragmentos, podem ser alterados ao ser submetidos a mutagênese aleatória por PCR propensa a erros, inserção aleatória de nucleotídeos ou outros métodos antes da recombinação. Um polinucleotídeo codificando um anticorpo ou seu fragmento que se liga especificamente a um antígeno pode ser recombinado com um ou mais componentes, motivos, seções, partes, domínios, fragmentos, etc. de uma ou mais moléculas heterólogas.

[00174] Para além disso, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção podem ser conjugados com sequências de marcador, tal como um peptídeo, para facilitar a purificação. Em modalidades preferenciais, a sequência de aminoácidos marcadores é um peptídeo de hexa-histidina (SEQ ID NO: 628), tal como a etiqueta

fornecida em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outras, muitas das quais se encontram comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por exemplo, a hexa-histidina (SEQ ID NO: 628) assegura purificação conveniente da proteína de fusão. Outras etiquetas de peptídeos úteis para purificação incluem, mas não se limitam a, etiqueta hemaglutinina ("HA"), que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina influenza (Wilson *et al.*, (1984) Cell 37:767), e a etiqueta "FLAG" (A. Einhauer *et al.*, J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001). De acordo com a presente invenção, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem também ser conjugados com peptídeos que penetram em tumores de modo a aumentar a sua eficácia.

[00175] Em outras modalidades, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da presente invenção são conjugados com um agente de diagnóstico ou agente detectável. Tais imunoconjugados podem ser úteis para monitorização ou prognóstico do início, desenvolvimento, progressão e/ou gravidade de uma doença ou distúrbio como parte de um procedimento de ensaio clínico, tal como determinar a eficácia de uma terapia particular. Tal diagnóstico e detecção podem ser alcançados acoplando o anticorpo a substâncias detectáveis incluindo, mas não se limitando a, várias enzimas, tais como, mas não se limitando a, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos, tais como, mas não se limitando a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; materiais fluorescentes tais como, mas não se limitando a, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor

647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como, mas não se limitando a, luminol; materiais bioluminescentes, tais como, mas não se limitando a, luciferase, luciferina e aequorina; materiais radioativos, tais como, mas não se limitando a, iodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I e^{121}I,), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^{3}H), índio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In e ^{111}In,), tecnécio (^{99}Tc), tálio (^{201}Ti), gálio (^{68}Ga, ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd), molibdénio (^{99}Mo), xénon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se, ^{64}Cu, ^{113}Sn e ^{117}Sn; e metais emissores de pósitrons usando várias tomografias por emissão de pósitrons e íons metálicos paramagnéticos não radioativos.

[00176] Os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalentes funcionais da invenção podem também ser ligados a suportes sólidos, que são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do antígeno alvo. Tais suportes sólidos incluem, mas não se limitam a, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, policloreto de vinila ou polipropileno.

2. Ligante

[00177] Como usado aqui, um “ligante” é qualquer porção química capaz de ligar um anticorpo, fragmento de anticorpo (por exemplo fragmentos de ligação ao antígeno) ou equivalente funcional a outra porção, tal como uma porção de fármaco. Os ligantes podem ser suscetíveis a clivagem (ligante clivável), tal como, clivagem induzida por ácido, clivagem induzida por peptidase, clivagem induzida por esterase, clivagem induzida por glicosidase, clivagem induzida por fosfodiesterase, clivagem induzida por fosfatase e clivagem de ligação de dissulfeto, em condições sob as quais o composto ou o anticorpo continuam

ativos. Em alternativa, os ligantes podem ser substancialmente resistentes a clivagem (por exemplo, ligante estável ou ligante não clivável). Em alguns aspectos, o ligante é um ligante procarregado, ligante hidrofílico ou um ligante à base de ácido dicarboxílico.

[00178] Em um aspecto, o ligante usado na presente invenção é derivado de um reagente de reticulação tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), iodoacetato de N-succinimidila (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil) ciclo-hexanocarboxilato (SMCC), 4-(maleimidometil) ciclo-hexanocarboxilato N- sulfos-succinimidila (sulfo-SMCC) ou 17-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetra-aza-heptadecan-1-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (CX1-1).

[00179] Ligantes não cliváveis são qualquer porção química capaz de ligar um fármaco, tal como um maitansinoide, a um anticorpo de modo estável e covalente e não se enquadra nas categorias listadas acima para ligantes cliváveis. Assim, ligantes não cliváveis são substancialmente resistentes a clivagem induzida por ácido, clivagem fotoinduzida, clivagem induzida por peptidase, clivagem induzida por esterase e clivagem de ligação de dissulfeto. Para além disso, não clivável refere-se à capacidade da ligação química no ligante ou de se juntar ao ligante para suportar a clivagem induzida por um ácido, agente de clivagem fotolábil, uma peptidase, uma esterase ou um composto químico ou fisiológico que cliva uma ligação de dissulfeto, em condições sob as quais o fármaco, tal como maitansinoide ou o anticorpo não perde a sua atividade.

[00180] Ligantes lábeis a ácido são ligantes cliváveis a um pH ácido. Por exemplo, certos compartimentos intracelulares, tais como en-

dossomos e lisossomos, possuem um pH ácido (pH 4-5) e fornecem condições adequadas para clivar ligantes lábeis a ácido.

[00181] Ligantes fotolábeis são ligantes que são úteis na superfície do corpo e em muitas cavidades do corpo que são acessíveis à luz. Além disso, a luz infravermelha pode penetrar o tecido.

[00182] Alguns ligantes podem ser clivados por peptidases, ou seja, ligantes cliváveis por peptidase. Apenas alguns peptídeos são prontamente clivados dentro ou fora das células, ver, por exemplo, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) e Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Além disso, os peptídeos são compostos de aminoácidos α e ligações peptídicas, que quimicamente são ligações de amida ente o carboxilato de um aminoácido e o grupo amino de um segundo aminoácido. Outras ligações de amida, tal como a ligação entre um carboxilato e o grupo amino ε de lisina, são entendidas como não sendo ligações peptídicas e são consideradas não cliváveis.

[00183] Alguns ligantes podem ser clivados por esterases, ou seja, ligantes cliváveis por esterase. Uma vez mais, apenas certos ésteres podem ser clivados por esterases presentes dentro ou fora das células. Os ésteres são formados pela condensação de um ácido carboxílico e um álcool. Ésteres simples são ésteres produzidos com álcoois simples, tais como álcoois alifáticos e álcoois cíclicos pequenos e aromáticos pequenos.

[00184] Ligantes procarregados são derivados de reagentes de reticulação carregados que retêm a sua carga após incorporação em um conjugado de anticorpo e fármaco. Exemplos de ligantes procarregados podem ser encontrados na US 2009/0274713.

3. Conjugação e Preparação de ADC

[00185] São conhecidos na técnica vários métodos de conjugar ligante-cargas úteis com uma porção de ligação ao antígeno (revistos,

por exemplo, em: Antibody-Drug Conjugate, Methods in Molecular Biology, Vol. 1045, Editor L. Ducry, Humana Press (2013)). Tradicionalmente, os fármacos são conjugados com resíduos de lisina nativa ou cisteína nativa do anticorpo. As preparações resultantes são misturas complexas. Mais recentemente, métodos de conjugação específicos de local estão sendo usados para melhorar o índice terapêutico e a homogeneidade de preparação de ADC (para revisão: Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab, H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. *mAbs* **2014**, *6*, 34). Para além da glicomanipulação, (Zhou, Q. et al. *Bioconjugate chemistry* **2014**, *25*, 510; Zhu, Z. et al. *mAbs* **2014**, *6*, 1190); alguns dos métodos mais comuns de preparação de ADC específicos de local são baseados na incorporação de cisteínas manipuladas, (Junutula, J. R. et al., *Nature biotechnology* **2008**, *26*, 925; Shinmi, D. et al., *Bioconjugate chemistry* **2016**, *27*, 1324), aminoácidos não canônicos (Tian, F. et al., *Proceedings National Academy of Sciences USA* **2014**, *111*, 1766; Axup, J. Y. et al., *Proceedings National Academy of Sciences USA* **2012**, *109*, 16101) ou sequências de peptídeo curtas na estrutura de base do anticorpo (Drake, P. M. et al., *Bioconjugate chemistry* **2014**, *25*, 1331; Strop, P. et al., *Chemistry & biology* **2013**, *20*, 161; Beerli, R. R. et al., *PloS one* **2015**, *10*, e0131177; Grunewald, J. et al., *Bioconjugate chemistry* **2015**, *26*, 2554). Estes métodos fornecem controle sobre estequiometria e local de ligação da citotoxina resultando em melhores perfis de farmacocinética (PK), segurança e eficácia dos conjugados em relação a ADC preparados da forma tradicional.

[00186] Os conjugados da presente invenção podem ser preparados por quaisquer métodos conhecidos na técnica, tais como os descritos nas Patentes US Nº 7,811,572, 6,411,163, 7,368,565 e 8,163,888, publicações de pedido de patente US 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 e 2012/0259100 e publicações PCT WO2014/124316 e WO2015/138615. Todos os ensinamentos destas

patentes e publicações de pedido de patente são incorporados aqui por referência.

Processo para Conjugação com Resíduos de Anticorpo de Cisteína Manipulada

[00187] Os conjugados da invenção podem ser preparados usando resíduos de cisteína manipulados em um anticorpo, por exemplo, através de mutagênese dirigida ao local. Tais conjugados específicos do local são homogêneos e possuem propriedades melhoradas (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) Nature Biotechnology 26:925-932.)

[00188] Devido ao fato de cisteínas manipuladas em anticorpos expressos em células de mamíferos serem modificadas por adutos (dissulfetos), tais como glutationa (GSH) e/ou cisteína durante a sua biossíntese (Chen *et al*. 2009), os resíduos de cisteína manipulados no produto como inicialmente expresso não são reativos a reagentes reativos de tiol, tais como grupos maleimido ou bromo- ou iodoacetamida. Para conjugar carga útil com uma cisteína manipula após expressão, adutos de glutationa ou cisteína precisam ser removidos reduzindo estes adutos de dissulfetos, o que geralmente implica também reduzir dissulfetos nativos na proteína expressa. A desproteção de cisteínas manipuladas provenientes de adução pode ser alcançada expondo primeiro o anticorpo a um agente de redução, por exemplo, ditiotreitol (DTT), TCEP ou cisteína reduzida, seguido de um procedimento que permite a reoxidação de todas as ligações de dissulfeto nativo de um anticorpo para restaurar e/ou estabilizar a estrutura de anticorpo funcional.

[00189] Podem ser usados vários métodos para reduzir e reoxidar anticorpos com resíduos de Cys manipulada para a preparação de conjugados de anticorpo e fármaco. Tentativas de seguir protocolos de reoxidação anteriormente descritas na literatura usando elevada concentração de $CuSO_4$ resultaram na precipitação de proteína (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) Nature Biotechnology 26:925). Preparamos com sucesso e obtivemos conjugados de anticorpo e fármaco com vários métodos diferentes para a redução e reoxidação de anticorpos.

[00190] Em um exemplo, DTT preparado de fresco é adicionado a anticorpos mutantes Cys purificados até uma concentração final de 10 mM. Após incubação com DTT à temperatura ambiente durante 1 hora, a mistura é dialisada a 4°C contra PBS por três dias com troca de tampão diária para remover DTT e reoxidar ligações de dissulfeto nativas do anticorpo. Um método alternativo é remover reagentes de redução através de uma coluna de dessalinização tal como Sephadex G-25, equilibrada com PBS. Uma vez reduzida totalmente a proteína, é adicionado opcionalmente 1 mM de ascorbato oxidado (ácido de-hidroascórbico) a amostras dessalinizadas e são realizadas incubações de reoxidação durante 20 a 24 horas.

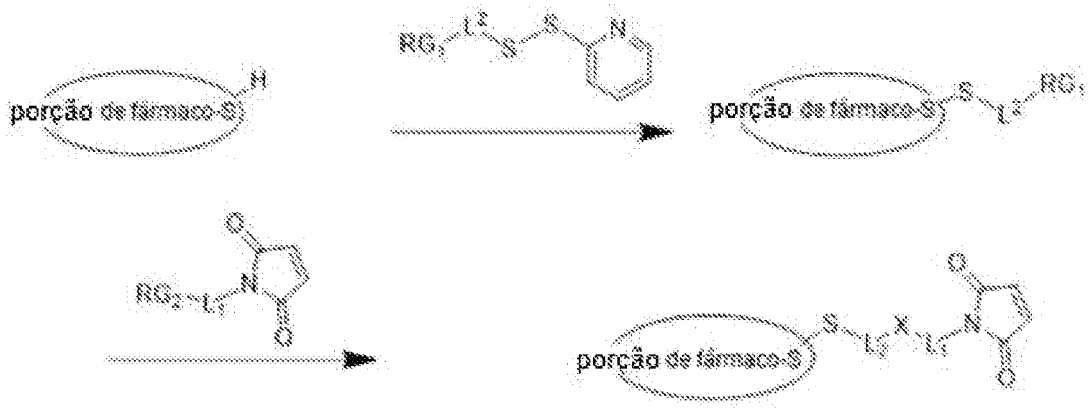
[00191] Em outro método exemplificativo, a desproteção de resíduos de CYS manipulados é alcançada adicionando cisteína totalmente reduzida em 20 mM de concentração a anticorpos ligados a resina de Proteína A-Sefarose. A redução dos adutos de Cys é alcançada por incubação durante aproximadamente 30 a 60 minutos à temperatura ambiente, o redundante sendo em seguida rapidamente removido la-

vando a resina com 50 leitos de PBS. A reoxidação do anticorpo reduzido é alcançada incubando a pasta fluida lavada à temperatura ambiente com ou sem adição de 50 a 2000 nM de $CuCl_2$ como acelerador. À exceção do uso de sulfato de cobre, os exemplos deste documento usam os protocolos aqui descritos com resultados semelhantes. A reoxidação restaura dissulfetos intracadeia, enquanto a diálise, dessalinização ou cromatografia de proteína A removem o agente redutor bem como cisteínas e glutationas inicialmente ligadas à ou às cisteínas manipuladas do anticorpo. Cromatografia de fase reversa HPLC é tipicamente usada para monitorar o processo de reoxidação: Anticorpos são carregados para uma coluna PLRP-S (4000 Å, 50 mm x 2,1 mm, Agilent) aquecida até 80º C e eluídos usando um gradiente linear de 30-45% de CH3CN em água contendo 0,1% de TFA a 1,5 mL/minuto e detecção de pico a 215, 254 e 280 nm.

[00192] Após reoxidação, o anticorpo é conjugado com uma porção de ligante-fármaco pré-formada. A título de exemplo, a porção de ligante-fármaco pré-formada (como, por exemplo, MMTBT-DM4; MPET-DM4; MBT-DM4; MEPET-DM4, MPBT-DM1; e outras porções de ligante-fármaco como descritas neste documento) são adicionadas a anticorpo mutante Cys reoxidado a 10 equivalentes molares relativamente ao anticorpo em tampão de PBS (pH 7,2). As incubações são realizadas durante 1 hora. O processo de conjugação é monitorado por HPLC de fase reversa, o qual permite separar anticorpos conjugados de anticorpos não conjugados. As misturas de reação de conjugação foram analisadas em uma coluna PRLP-S (4000Å, 50 mm x 2,1 mm, Agilent) aquecida até 80 °C e é realizada eluição da coluna por meio de um gradiente linear de 30 a 60% de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA a uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. A eluição de proteínas da coluna é monitorada a 280 nm, 254 nm e 215 nm.

[00193] Em uma modalidade, podem ser preparados exemplos de

porção de ligante-fármaco para conjugação de cisteína de acordo com os Esquemas 1 a 3:



Esquema 1

em que:

a porção de fármaco é ligada ao ligante por meio de uma funcionalidade tiol;

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

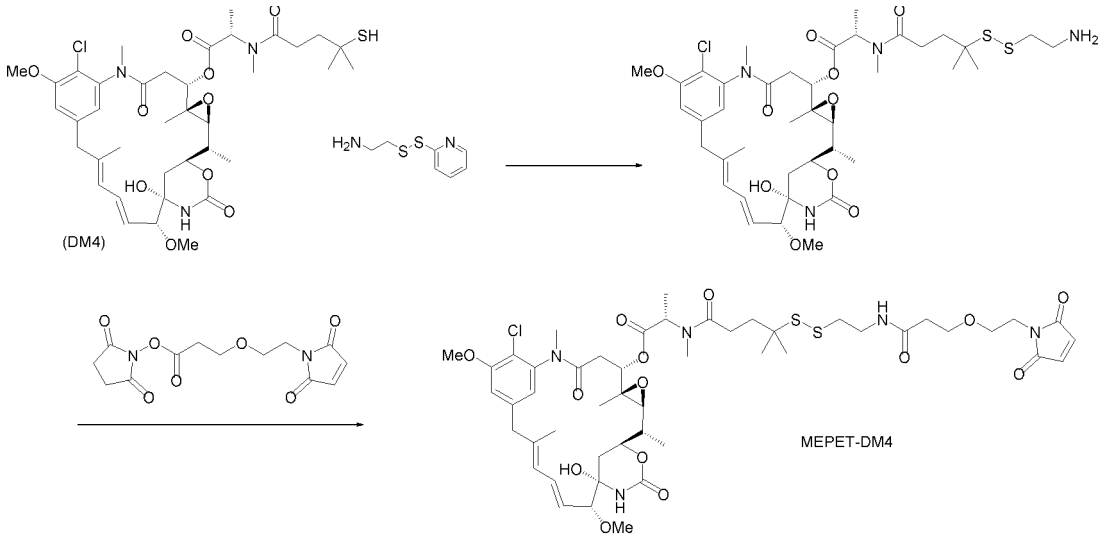
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

RG1 e RG2 são 2 grupos reativos formando o grupo X.

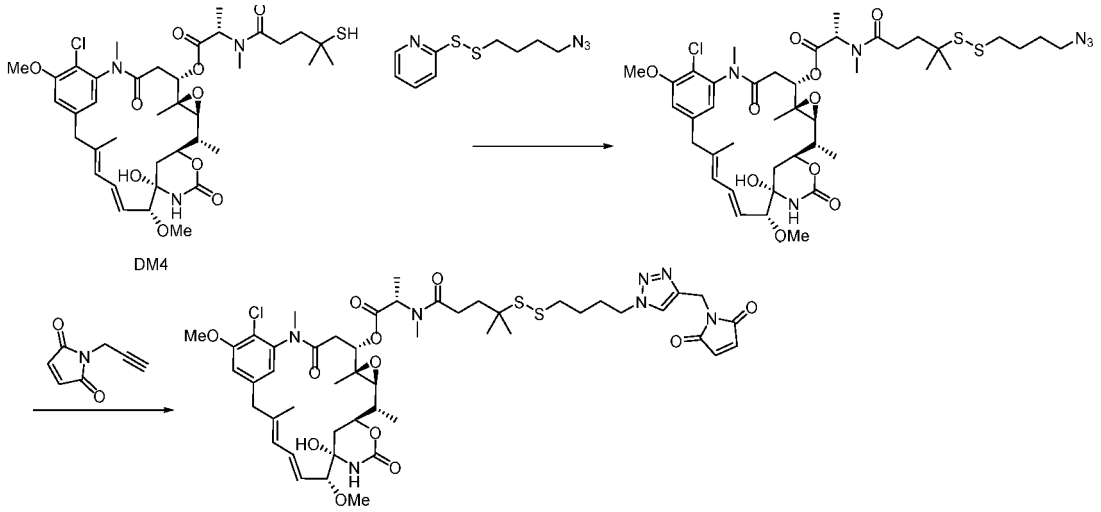
[00194] Os grupos em reação que formam uma amida ou um triazol são bem conhecidos na técnica.

[00195] Um exemplo de pré-formação da porção de ligante-fármaco é representado no Esquema 2, em que a porção de fármaco é DM4; RG1 é um grupo amino e RG2 é um ácido ativado, resultando na formação da ligação amida (X):



Esquema 2.

[00196] Outro exemplo de pré-formação da porção de ligante-fármaco é representado no Esquema 3, em que a porção de fármaco é DM4; RG1 é um grupo azida e RG2 é um grupo alquina, resultando na formação do tetrazol (X):



Esquema 3

[00197] A eficiência de conjugação de várias porções de fármaco possuindo uma maleimida ligada a um anticorpo mutante Cys varia dependendo da solubilidade das porções de fármaco usadas. Contudo, muitas reações resultam em mais do que 90% de conjugado. Para avaliar o estado de agregação, os conjugados resultantes são analisados em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (GE, Superdex200, 3,2/30) a uma taxa de fluxo de 0.1 ml/min em PBS. To-

dos os conjugados são maioritariamente monoméricos. A maioria dos conjugados contém menos de 3% de material dimérico e oligomérico, indicando que a conjugação da porção de fármaco possuindo uma maleimida ligada a anticorpo mutante Cys não causa agregação.

[00198] Os imunoconjugados são também caracterizados em termos de carga média de uma porção de fármaco para porção de ligação de anticorpo, normalmente referida como razão de fármaco-para-anticorpo (DAR). O valor DAR é extrapolado, por exemplo, a partir de dados LC-MS para amostras reduzidas e desglicosiladas. A LC/MS permite a quantificação do número médio de moléculas de carga útil (porção de fármaco) fixadas a um anticorpo em um ADC. HPLC separa um anticorpo em cadeias pesadas e leves e também separa a cadeia pesada (HC) e a cadeia leve (LC) de acordo com o número de grupos de Ligante-Carga Útil por cadeia. Os dados espectrais de massa permitem a identificação da espécie de componente na mistura, por exemplo, LC, LC+1, LC+2, HC, HC+1, HC+2, etc. A partir da carga média das cadeias LC e HC, a DAR média pode ser calculada para um ADC. A DAR para uma determinada amostra de imunoconjugado representa o número médio de moléculas de fármaco (carga útil) fixadas a um anticorpo tetramérico contendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas.

Processo para Conjugação com Resíduos de Anticorpo de Cisteína Nativa

[00199] As porções de ligante-fármaco como aqui descritas podem também ser conjugadas com resíduos de cisteína nativa de anticorpos não manipulados usando um procedimento que envolve redução parcial dos anticorpos (Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cerveny, C. G., Chace, D. F., DeBlanc, R. L., Gearing,R. P., Bovee, T. D., Siegall, C. B., Francisco, J. A., Wahl, A. F., Meyer, D. L. e Senter, P. D. (2003) Development of potent monoclonal antibody auris-

tatin conjugates for cancer therapy. *Nat. Biotechnol. 21*, 778-784). O protocolo que se segue é um exemplo não limitativo de como tais conjugados podem ser preparados: Ligações de dissulfeto inter e intracadeia do anticorpo (a uma concentração típica de 5 a 10 mg/ml) são em primeiro lugar parcialmente reduzidas em PBS contendo EDTA a 2 mM adicionando TCEP até uma concentração final de 10 mM e incubando a mistura a 37°C durante 1 hora. Após dessalinizar e adicionar 1% p/v de detergente PS-20, os anticorpos parcialmente reduzidos (1-2 mg/ml) são reagidos durante a noite a 4°C com 0,5 a 1 mg de uma maleimida contendo composto de carga útil de ligante por 10 mg de anticorpo. Os conjugados resultantes são purificados por cromatografia de Proteína A através de métodos padrão e com tampão trocado para PBS, e são perfilados tipicamente por espectometria de massa (MS), cromatografia por exclusão de tamanho analítica (AnSEC), e cromatografia de interação hidrofóbica analítica (AnHIC) quanto à sua razão fármaco-para-anticorpo, propensão a agregação e hidrofobicidade, bem como por ensaios de atividade.

Processo de uma só etapa para reticulação com resíduos de anticorpo de lisina

[00200] Em uma modalidade, os conjugados da presente invenção podem ser preparados por meio de um processo de uma só etapa para reticulação do fármaco com resíduos de lisina no anticorpo. O processo compreende combinar o anticorpo, fármaco e agente de reticulação em um meio substancialmente aquoso, contendo opcionalmente um ou mais cossolventes, a um pH adequado. Em uma modalidade, o processo compreende a etapa de contatar o anticorpo da presente invenção com um fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) para formar uma primeira mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco, e em seguida contatar a primeira mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco com um agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC,

SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) em uma solução possuindo um pH de cerca de 4 a cerca de 9 para fornecer uma mistura compreendendo (i) o conjugado (por exemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 ou Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco livre (por exemplo, DM1 ou DM4) e (iii) produtos secundários da reação.

[00201] Em uma modalidade, o processo de uma só etapa compreende contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) em uma solução com um pH de cerca de 6 ou mais (por exemplo, cerca de 6 a cerca de 9, cerca de 6 a cerca de 7, cerca de 7 a cerca de 9, cerca de 7 a cerca de 8,5, cerca de 7,5 a cerca de 8,5, cerca de 7,5 a cerca de 8,0, cerca de 8,0 a cerca de 9,0 ou cerca de 8,5 a cerca de 9,0). Por exemplo, o processo inventivo compreende contatar o agente de ligação de células com o fármaco (DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) em uma solução com um pH de cerca de 6,0, cerca de 6,1, cerca de 6,2, cerca de 6,3, cerca de 6,4, cerca de 6,5, cerca de 6,6, cerca de 6,7, cerca de 6,8, cerca de 6,9, cerca de 7,0, cerca de 7,1, cerca de 7,2, cerca de 7,3, cerca de 7,4, cerca de 7,5, cerca de 7,6, cerca de 7,7, cerca de 7,8, cerca de 7,9, cerca de 8,0, cerca de 8,1, cerca de 8,2, cerca de 8,3, cerca de 8,4, cerca de 8,5, cerca de 8,6, cerca de 8,7, cerca de 8,8, cerca de 8,9 ou cerca de 9,0. Em uma modalidade específica, o processo inventivo compreende contatar um agente de ligação de células com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) em uma solução possuindo um pH de cerca de 7,8 (por exemplo, um pH de 7,6 a 8,0 ou um pH de 7,7 a 7,9).

[00202] O processo de uma só etapa (ou seja, contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente

de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) pode ser levado a cabo a qualquer temperatura adequada conhecida da técnica. Por exemplo, o processo de uma só etapa pode ocorrer a cerca de 20°C ou menos (por exemplo, a cerca de -10°C (desde que se evite que a solução congele, por exemplo, pela presença de solvente orgânico usado para dissolver o agente citotóxico e o reagente de reticulação bifuncional) a cerca de 20°C, cerca de 0°C a cerca de 18°C, cerca de 4°C a cerca de 16°C), à temperatura ambiente (por exemplo, cerca de 20°C a cerca de 30°C ou cerca de 20°C a cerca de 25°C), ou a uma temperatura elevada (por exemplo, cerca de 30°C a cerca de 37°C). Em uma modalidade, o processo de uma só etapa ocorre à temperatura de cerca de 16°C a cerca de 24°C (por exemplo, cerca de 16°C, cerca de 17°C, cerca de 18°C, cerca de 19°C, cerca de 20°C, cerca de 21°C, cerca de 22°C, cerca de 23°C, cerca de 24°C ou cerca de 25°C). Em outra modalidade, o processo de uma só etapa é realizado a uma temperatura de cerca de 15°C ou menos (por exemplo, cerca de -10°C a cerca de 15°C, ou cerca de 0°C a cerca de 15°C). Por exemplo, o processo compreende contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) a uma temperatura de 15°C, cerca de 14°C, cerca de 13°C, cerca de 12°C, cerca de 11°C, cerca de 10°C, cerca de 9°C, cerca de 8°C, cerca de 7°C, cerca de 6°C, cerca de 5°C, cerca de 4°C, cerca de 3°C, cerca de 2°C, cerca de 1°C, cerca de 0°C, cerca de -1°C, cerca de -2°C, cerca de -3°C, cerca de -4°C, cerca de -5°C, cerca de -6°C, cerca de -7°C, cerca de -8°C, cerca de -9°C ou cerca de -10°C, desde que se evite que a solução congele, por exemplo, pela presença de um ou mais solventes orgânicos usados para dissolver o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, Sulfo-SPDB SPDB ou CX1-1). Em uma modalidade, o processo compreende con-

tatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) a uma temperatura de cerca de -10°C a cerca de 15°C, cerca de 0°C a cerca de 15°C, cerca de 0°C a cerca de 10°C, cerca de 0°C a cerca de 5°C, cerca de 5°C a cerca de 15°C, cerca de 10°C a cerca de 15°C ou cerca de 5°C a cerca de 10°C. Em outra modalidade, o processo compreende contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) a uma temperatura de cerca de 10°C (por exemplo, uma temperatura de 8°C a 12°C ou uma temperatura de 9°C a 11°C).

[00203] Em uma modalidade, o contatar acima descrito é realizado fornecendo o anticorpo e, em seguida, contatando o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) para formar uma primeira mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4), e, em seguida, contatando a primeira mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) como agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1). Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo é fornecido em um recipiente de reação, o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) é adicionado ao recipiente de reação (contatando, assim, o anticorpo), e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) é adicionado à mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) (contatando, assim, a mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco). Em uma modalidade, o anticorpo é fornecido em um recipiente de reação e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) é adicionado ao recipiente de reação imediatamente a seguir a fornecer o anticorpo ao recipiente. Em outra modalidade, o anticorpo é fornecido em um recipiente de reação e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) é adicionado ao recipi-

ente de reação depois de um intervalo de tempo a seguir a fornecer o anticorpo ao recipiente (por exemplo, cerca de 5 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 1 dia ou mais após fornecer o agente de ligação de células ao espaço). O fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) pode ser adicionado rapidamente (ou seja, dentro de um intervalo de tempo curto, tal como cerca de 5 minutos, cerca de 10 minutos) ou lentamente (tal como usando uma bomba).

[00204] A mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) pode então ser contatada com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) imediatamente após contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) ou mais tarde (por exemplo, cerca de 5 minutos a cerca de 8 horas ou mais tarde) após contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4). Por exemplo, em uma modalidade, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) é adicionado à mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) imediatamente após a adição do fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) ao recipiente de reação compreendendo o anticorpo. Em alternativa, a mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) pode ser contatada com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) a cerca de 5 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas ou mais após contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4).

[00205] Após a mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) ser contatada com o agente de reticulação (por exemplo SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1)

se permite que a reação continue durante cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou mais (por exemplo, cerca de 30 horas, cerca de 35 horas, cerca de 40 horas, cerca de 45 horas ou cerca de 48 horas).

[00206] Em uma modalidade, o processo de uma só etapa compreende ainda uma etapa de interrupção para interromper qualquer fármaco não reagido (por exemplo, DM1 ou DM4) e/ou agente de reticulação não reagido (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1). A etapa de interrupção é realizada tipicamente antes da purificação do conjugado. Em uma modalidade, a mistura é interrompida contatando a mistura com um reagente de interrupção. Como usado aqui, o "reagente de interrupção" refere-se a um reagente que reage com o fármaco livre (por exemplo, DM1 ou DM4) e/ou agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1). Em uma modalidade, podem ser usados reagentes de interrupção de maleimida ou haloacetamida, tal como ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiônico, N-etilmaleimida, iodoacetamida ou ácido iodoacetamidopropiônico, para assegurar que qualquer grupo não reagido (tal como tiol) no fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) seja interrompido. A etapa de interrupção pode ajudar a evitar a dimerização do fármaco (por exemplo, DM1). O DM1 dimerizado pode ser difícil de remover. Após interrupção com reagentes polares carregados que interrompem tiol (tal como ácido 4-maleimidobutírico ou ácido 3-maleimidopropiônico), o DM1 em excesso não reagido é convertido em um aduto polar carregado e solúvel em água que pode ser

facilmente separado do conjugado ligado covalentemente durante a etapa de purificação. Pode também ser usada interrupção com reagentes não polares e neutros que interrompem tiol. Em uma modalidade, a mistura é interrompida contatando a mistura com um reagente de interrupção que reage com o agente de reticulação não reagido (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1). Por exemplo, podem ser adicionados nucleófilos à mistura de modo a interromper qualquer SMCC não reagido. De preferência, o nucleófilo é um grupo amino contendo nucleófilo, tal como lisina, taurina e hidroxilamina.

[00207] Em uma modalidade preferencial, se permite que a reação (ou seja, contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) e, em seguida, o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1)) termine antes de contatar a mistura com um reagente de interrupção. A este respeito, o reagente de interrupção é adicionado à mistura cerca de 1 hora a cerca de 48 horas (por exemplo, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 25 horas a cerca de 48 horas) após a mistura contendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1 ou DM4) ser contatada com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1).

[00208] Em alternativa, a mistura é interrompida reduzindo o pH da mistura para cerca de 5,0 (por exemplo, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 ou 5,2). Em outra modalidade, a mistura é interrompida reduzindo o pH para me-

nos de 6.0, menos de 5,5, menos de 5,0, menos de 4,8, menos de 4,6, menos de 4,4, menos de 4,2, menos de 4,0. Em alternativa, o pH é reduzido para cerca de 4,0 (por exemplo, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 ou 4,2) a cerca de 6,0 (por exemplo, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 ou 6,2), cerca de 4,0 a cerca de 5,0, cerca de 4,5 (por exemplo, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 ou 4,7) a cerca de 5,0. Em uma modalidade, a mistura é interrompida reduzindo o pH da mistura para 4,8. Em outra modalidade, a mistura é interrompida reduzindo o pH da mistura para 5,5.

[00209] Em uma modalidade, o processo de uma só etapa compreende ainda uma etapa de retenção para liberar do anticorpo os ligantes ligados de forma instável. A etapa de retenção compreende reter a mistura antes da purificação do conjugado (por exemplo, após a etapa de reação, entre a etapa de reação e a etapa de interrupção, ou após a etapa de interrupção). Por exemplo, o processo compreende (a) contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) para formar uma mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4); e, em seguida, contatar a mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1), em uma solução com um pH de cerca de 4 a cerca de 9, para fornecer uma mistura compreendendo (i) o conjugado (por exemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 ou Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) e (iii) produtos secundários da reação, (b) retenção da mistura preparada na etapa (a) para liberar os ligantes ligados de forma instável do agente de ligação de células e (c) purificar a mistura para fornecer um conjugado purificado.

[00210] Em outra modalidade, o processo compreende (a) contatar o anticorpo com o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) para formar uma mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por

exemplo, DM1, DM3 ou DM4); e, em seguida, contatar a mistura compreendendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1), em uma solução com um pH de cerca de 4 a cerca de 9, para fornecer uma mistura compreendendo (i) o conjugado, (ii) fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) e (iii) produtos secundários da reação, (b) interrupção da mistura preparada na etapa (a) para interromper qualquer fármaco não reagido (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) e/ou agente de reticulação não reagido (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1), (c) retenção da mistura preparada na etapa (b) para liberar os ligantes ligados de forma instável do agente de ligação de células e (d) purificar a mistura para fornecer um conjugado purificado (por exemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 ou Ab-CX1-1-DM1).

[00211] Em alternativa, a etapa de retenção pode ser realizada após a purificação do conjugado, seguida de uma etapa de purificação adicional.

[00212] Em uma modalidade preferencial, se permite que a reação termine antes da etapa de retenção. A este respeito, a etapa de retenção pode ser realizada cerca de 1 hora a cerca de 48 horas (por exemplo, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 24 horas a cerca de 48 horas) após a mistura contendo o anticorpo e o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) ser contatada com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1).

[00213] A etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura adequada (por exemplo, cerca de 0°C a cerca de 37°C) durante um período de tempo adequado (por exemplo, cerca de 1 hora a cerca de 1 semana, cerca de 1 hora a cerca de 24 horas, cerca de 1 hora a cerca de 8 horas ou cerca de 1 hora a cerca de 4 horas) para liberar os ligantes ligados de forma instável do anticorpo e simultaneamente não liberando substancialmente os ligantes ligados de forma estável do anticorpo. Em uma modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a cerca de 20 °C ou menos (por exemplo, cerca de 0°C a cerca de 18°C, cerca de 4°C a cerca de 16°C), à temperatura ambiente (por exemplo, cerca de 20°C a cerca de 30°C ou cerca de 20°C a cerca de 25°C), ou a uma temperatura elevada (por exemplo, cerca de 30°C a cerca de 37°C). Em uma modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura de cerca de 16°C a cerca de 24°C (por exemplo, cerca de 15°C, cerca de 16°C, cerca de 17°C, cerca de 18°C, cerca de 19°C, cerca de 20°C, cerca de 21°C, cerca de 22°C, cerca de 23°C, cerca de 24°C ou cerca de 25°C). Em outra modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura de cerca de 2°C a cerca de 8°C (por exemplo, cerca de 0°C, cerca de 1°C, cerca de 2°C, cerca de 3°C, cerca de 4°C, cerca de 5°C, cerca de 6°C, cerca de 7°C, cerca de 8°C, cerca de 9°C ou cerca de 10°C). Em outra modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura de cerca de 37°C (por exemplo, cerca de 34°C, cerca de 35°C, cerca de 36°C, cerca de 37°C, cerca de 38°C, cerca de 39°C ou cerca de 40°C).

[00214] A duração da etapa de retenção depende da temperatura e do pH aos quais a etapa de retenção é realizada. Por exemplo, a duração da etapa de retenção pode ser substancialmente reduzida realizando a etapa de retenção a temperatura elevada, com a temperatura máxima limitada pela estabilidade do conjugado de agente de ligação

de célula-agente citotóxico. A etapa de retenção pode compreender manter a solução durante cerca de 1 hora a cerca de 1 dia (por exemplo, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 12 horas, cerca de 14 horas, cerca de 16 horas, cerca de 18 horas, cerca de 20 horas, cerca de 22 horas ou cerca de 24 horas), cerca de 10 horas a cerca de 24 horas, cerca de 12 horas a cerca de 24 horas, cerca de 14 horas a cerca de 24 horas, cerca de 16 horas a cerca de 24 horas, cerca de 18 horas a cerca de 24 horas, cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, cerca de 5 horas a cerca de 1 semana, cerca de 20 horas a cerca de 1 semana, cerca de 12 horas a cerca de 1 semana (por exemplo, cerca de 12 horas, cerca de 16 horas, cerca de 20 horas, cerca de 24 horas, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias ou cerca de 7 dias) ou cerca de 1 dia a cerca de 1 semana.

[00215] Em uma modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante um período de pelo menos cerca de 12 horas a até uma semana. Em outra modalidade, a etapa de retenção compreende manter a solução a uma temperatura de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante a noite (por exemplo, cerca de 12 a cerca de 24 horas, de preferência cerca de 20 horas).

[00216] O valor de pH para a etapa de retenção é de preferência cerca de 4 a cerca de 10. Em uma modalidade, o valor de pH para a etapa de retenção é de cerca de 4 ou mais, mas inferior a cerca de 6 (por exemplo, 4 a 5,9) ou cerca de 5 ou mais, mas inferior a cerca de 6 (por exemplo, 5 a 5,9). Em outra modalidade, os valores de pH para a etapa de retenção variam de cerca de 6 a cerca de 10 (por exemplo, cerca de 6,5 a cerca de 9, cerca de 6 a cerca de 8). Por exemplo, os

valores de pH para a etapa de retenção podem ser de cerca de 6, cerca de 6,5, cerca de 7, cerca de 7,5, cerca de 8, cerca de 8,5, cerca de 9, cerca de 9,5 ou cerca de 10.

[00217] Em modalidades específicas, a etapa de retenção pode compreender incubar a mistura a 25°C a um pH de cerca de 6 a 7,5 durante cerca de 12 horas a cerca de 1 semana, incubando a mistura a 4°C a um pH de cerca de 4,5 a 5,9 durante cerca de 5 horas a cerca de 5 dias, ou incubando a mistura a 25°C a um pH de cerca de 4,5 a 5,9 durante cerca de 5 horas a cerca de 1 dia.

[00218] O processo de uma só etapa pode opcionalmente incluir a adição de sacarose à etapa de reação para aumentar a solubilidade e recuperação dos conjugados. Desejavelmente, a sacarose é adicionada a uma concentração de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 20% (p/v) (por exemplo, cerca de 0,1% (p/v), 1% (p/v), 5% (p/v), 10% (p/v), 15% (p/v) ou 20% (p/v)). De preferência, a sacarose é adicionada a uma concentração de cerca de 1% (p/v) a cerca de 10% (p/v) (por exemplo, cerca de 0,5% (p/v), cerca de 1% (p/v), cerca de 1,5% (p/v), cerca de 2% (p/v), cerca de 3% (p/v), cerca de 4% (p/v), cerca de 5% (p/v), cerca de 6% (p/v), cerca de 7% (p/v), cerca de 8% (p/v), cerca de 9% (p/v), cerca de 10% (p/v) ou cerca de 11% (p/v)). Além disso, a etapa de reação pode também compreender a adição de um agente de tamponamento. Pode ser usado qualquer agente de tamponamento adequado conhecido na técnica. Agentes de tamponamento adequados incluem, por exemplo, um tampão de citrato, um tampão de acetato, um tampão de succinato e um tampão de fosfato. Em uma modalidade, o agente de tamponamento é selecionado a partir do grupo consistindo em HEPPSO (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxipropanossulfônico)), POPSO (piperazina-1,4-bis-(ácido 2-hidróxi-propano-sulfônico) desidratado), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico), HEPPS (EPPS) (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-

propanossulfônico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanossulfônico), e uma sua combinação.

[00219] Em uma modalidade, o processo de uma só etapa pode compreender ainda a etapa de purificar a mistura para fornecer o conjugado purificado (por exemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 ou Ab-CX1-1-DM1). Quaisquer métodos de purificação conhecidos na técnica podem ser usados para purificar os conjugados da presente invenção. Em uma modalidade, os conjugados da presente invenção são submetidos a filtração de fluxo tangencial (TFF), cromatografia não adsorvente, cromatografia de adsorção, filtração de adsorção, precipitação seletiva ou qualquer processo de purificação adequado, bem como suas combinações. Em outra modalidade, antes de submeter os conjugados ao processo de purificação acima descrito, os conjugados são primeiro filtrados através de uma ou mais membranas PVDF. Em alternativa, os conjugados são filtrados através de uma ou mais membranas PVDF após submeter os conjugados ao processo de purificação acima descrito. Por exemplo, em uma modalidade, os conjugados são filtrados através de uma ou mais membranas PVDF e depois purificados usando filtração de fluxo tangencial. Em alternativa, os conjugados são purificados usando filtração de fluxo tangencial e depois filtrados através de uma ou mais membranas PVDF.

[00220] Quaisquer sistemas TFF adequados podem ser utilizados para purificação, incluindo um sistema tipo Pellicon (Millipore, Billerica, MA), um sistema de cassetes Sartocon (Sartorius AG, Edgewood, NY) e um sistema de tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

[00221] Pode ser usada qualquer resina de cromatografia de adsorção para purificação. Resinas de cromatografia de adsorção preferenciais incluem cromatografia de hidroxiapatita, cromatografia de indução com carga hidrofóbica (HCIC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de troca iônica, cromatografia de troca iônica de

modo misto, cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), cromatografia de corante-ligante, cromatografia de afinidade, cromatografia de fase reversa e suas combinações. Exemplos de resinas de hidroxiapatita adequadas incluem hidroxiapatita cerâmica (CHT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxiapatita Ultrogel HA (Pall Corp., East Hills, NY),e fluoroapatita cerâmica (CFT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Um exemplo de resina HCIC adequada é resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Exemplos de resinas HIC adequadas incluem as resinas Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepaharose, Phenyl-Sepharose e Octyl Sepharose (todas da GE Healthcare, Piscataway, NJ), bem como resinas Macro-prep Methyl e Macro-Prep t-Butyl (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Exemplos de resinas de troca iônica adequadas incluem resinas SP-Sepharose, CM-Sepharose e Q-Sepharose (todas da GE Healthcare, Piscataway, NJ), e resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Exemplos de trocadores de íons de modo misto adequados incluem resina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Exemplos de resinas IMAC adequadas incluem resina Chelating Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) e resina Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Exemplos de resinas de corante-ligante adequadas incluem resina Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) e resina Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Exemplos de resinas de afinidade adequadas incluem resina Sepharose de Proteína A (por exemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) e resinas de afinidade de lectina, por exemplo, resina Lentil Lectina Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), onde o anticorpo contém locais de ligação de lectina apropriados. Exemplos de resinas de fase reversa adequada incluem resinas C4, C8 e C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

[00222] Pode ser usada qualquer resina de cromatografia não ad-

sorvente para purificação. Exemplos de resinas de cromatografia não adsorventes adequadas incluem, mas não se limitam a, resinas SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (por exemplo, S-200 e S-300), resinas SUPERDEX™ (por exemplo, SUPERDEX™ 75 e SUPERDEX™ 200), resinas BIO-GEL® (por exemplo, P-6, P-10, P-30, P-60 e P-100), e outras conhecidas dos entendidos na técnica.

Processo de duas etapas e Processo em um Recipiente para reticulação com resíduos de anticorpo de lisina

[00223] Em uma modalidade, os conjugados da presente invenção podem ser preparados como descrito na Patente U.S. 7,811,572 e Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2006/0182750. O processo compreende as etapas de (a) contatar o anticorpo da presente invenção com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1) para ligar covalentemente o ligante (ou seja, Ab-SMCC, Ab-SPDB ou Ab-CX1-1) ao anticorpo e preparar assim uma primeira mistura compreendendo o anticorpo possuindo o ligante ligado ao mesmo; (b) submeter opcionalmente a primeira mistura a um processo de purificação para preparar uma primeira mistura purificada do anticorpo possuindo o ligante ligado ao mesmo; (c) conjugar o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) com o anticorpo possuindo o ligante ligado ao mesmo na primeira mistura reagindo o anticorpo possuindo o ligante ligado ao mesmo com o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) em uma solução com um pH de cerca de 4 a cerca de 9 para preparar uma segunda mistura compreendendo (i) conjugado (por exemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 ou Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco livre (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4); e (iii) produtos secundários da reação; e (d) submeter a segunda mistura a um processo de purificação para purificar o conjugado dos outros componentes da segunda mistura. Em alternativa, a etapa de purificação (b) pode ser omitida. Quaisquer métodos de purificação aqui descritos po-

dem ser usados para as etapas (b) e (d). Em uma modalidade, TFF é usado para ambas as etapas (b) e (d). Em outra modalidade, TFF é usado para a etapa (b) e cromatografia com absorção (por exemplo, CHT) é usada para a etapa (d).

Reagente de uma só etapa e Processo In-Situ para reticulação com resíduos de anticorpo de lisina

[00224] Em uma modalidade, os conjugados da presente invenção podem ser preparados conjugando composto ligante-fármaco pré-formado (por exemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 ou CX1-1-DM1) com o anticorpo da presente invenção, como descrito na Patente U.S. 6,441,163 e nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nºs 2011/0003969 e 2008/0145374, seguido de uma etapa de purificação. Pode ser usado qualquer um dos métodos de purificação aqui descritos. O composto ligante-fármaco é preparado reagindo o fármaco (por exemplo, DM1, DM3 ou DM4) com o agente de reticulação (por exemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB ou CX1-1). O composto ligante-fármaco (por exemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 ou CX1-1-DM1) é opcionalmente submetido a purificação antes de ser conjugado com o anticorpo.

Anticorpos Anti-CCR7

[00225] A presente invenção fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7. Os anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) da invenção incluem, porém sem limitação, os anticorpos monoclonais humanos ou seus fragmentos, isolados como descrito nos Exemplos.

[00226] A presente invenção, em certas modalidades, fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, frag-

mentos de ligação ao antígeno) compreendem um domínio VH tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 45, 77 ou 608. A presente invenção, em certas modalidades, fornece também anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) compreendem uma CDR VH tendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDR VH listadas nas Tabelas 1 e 4, *infra*. Em modalidades particulares, a invenção fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos compreendem (ou, alternativamente, consistem de) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDR VH tendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDR VH listadas nas Tabelas 1 e 4, *infra*.

[00227] A presente invenção fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) compreendem um domínio VL tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 61, 93 ou 624. A presente invenção fornece também anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) compreendem uma CDR VL tendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDR VL listadas nas Tabelas 1 e 4, *infra*. Em particular, a invenção fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente a CCR7, em que os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo compreendem (ou,

alternativamente, consistem de) uma, duas, três ou mais CDR VL tendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDR VL listadas nas Tabelas 1 e 4, *infra*.

[00228] Outros anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) da invenção incluem aminoácidos que sofreram mutação, tendo, contudo, pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 por cento de identidade nas regiões CDR com as regiões CDR representadas nas sequências descritas nas Tabelas 1 e 4. Em certas modalidades, os anticorpos compreendem sequências de aminoácidos mutantes em que não mais do que 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos sofreram mutação nas regiões CDR em comparação com as regiões CDR representadas na sequência descrita nas Tabelas 1 e 4.

[00229] A presente invenção também fornece sequências de ácidos nucleicos que codificam VH, VL, a cadeia pesada de comprimento total e a cadeia leve de comprimento total dos anticorpos que se ligam especificamente a CCR7. Tais sequências de ácidos nucleicos podem ser otimizadas para expressão em células de mamífero.

[00230] Ao longo de todo o texto deste pedido, caso exista uma discrepância entre o texto do relatório descritivo e a listagem de sequências, o texto do relatório descritivo deverá prevalecer.

Tabela 1. Exemplos de Anticorpos Anti-CCR7 da Presente Invenção

506E15 (CysMab DAPA humanizado)		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinado)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinado)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV

SEQ ID NO: 10	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 11	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 12	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 13	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSG GSFTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 14	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGCTC CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCG GCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATG TCCTGGATCCGGCAGGCCCCTGGCAA GGGACTGGAGTGGGTGGCCACCATC TCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTA CCCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGTGCCAGACGGGCCTCCACCGT CGTGGGCACCGATTTCGATGTGTGGG GCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTC CTCC
SEQ ID NO: 15	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, CysMab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSG GSFTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP**C**DIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

		LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGCTC CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCG GCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATG TCCTGGATCCGGCAGGCCCCTGGCAA GGGACTGGAGTGGGTGGCCACCATC TCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTA CCCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGTGCCAGACGGGCCTCCACCGT CGTGGGCACCGATTTCGATGTGTGGG GCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTC CTCCGCCTCCACCAAGGGACCCTCCG TGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAG TCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCTGCCCTGTGACAGTGTCCTGGAAC TCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTC GTGACCGTGCCTTCCTCCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCTCCAACACCAAAGTG GACAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTG CGACAAGACCCACACCTGTCCTCCCT GCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGG CCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCAAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCC GGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGCCGTGTCCCACGAGGATCCCG AAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGAC CAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACT CCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGT

		CCAACAAGGCCCTGGCCGCTCCCATC GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGG CCAGCCCAGAGAGCCCCAAGTGTACA CACTGCCTCCCAGCCGGGAAGAGATG ACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACCTG CCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTGCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAAC GGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGAC CACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGAC GGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCC CCGGCAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (Combinado)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 18	LCDR2 (Combinado)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 (Combinado)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 20	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 21	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 22	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 23	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 24	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 25	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 26	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 27	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 28	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 29	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQ DIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFV VYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 30	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTC CAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATA GAGTGACCCTGACCTGCCGGGCCTC CCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACT GGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC CATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCT CCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCC CGGTTCTCTGGCTCCAGATCCGGCAC

		CGACTACACCCTGACCATCTCCAGCC TGCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTAC TACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCC TCCCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGC TGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 31	Cadeia Leve	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQ DIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFV VYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	Cadeia Leve de DNA	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTC CAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATA GAGTGACCCTGACCTGCCGGGCCTC CCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACT GGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC CATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCT CCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCC CGGTTCTCTGGCTCCAGATCCGGCAC CGACTACACCCTGACCATCTCCAGCC TGCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTAC TACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCC TCCCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGC TGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCA GAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
121G12 (CysMal		

humanizado, DAPA)		
SEQ ID NO: 33	HCDR1 (Combinado)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 34	HCDR2 (Combinado)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 35	HCDR3 (Combinado)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 36	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 37	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 38	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 39	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 40	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 41	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 42	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 43	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 44	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 45	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDA GSYSYYPDNVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYY VMDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 46	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGCTC CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCG GCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGT CCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGAAA GGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATC TCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTA CCCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGACGGGGCTCCAGATA CGAAGAGTACTACGTGATGGACTACT GGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGT GTCCTCC
SEQ ID NO: 47	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, CysMab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDA GSYSYYPDNVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYY VMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA

		PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**V SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP **C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 48	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGCTC CCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCG GCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGT CCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGAAA GGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATC TCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTA CCCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGACGGGGCTCCAGATA CGAAGAGTACTACGTGATGGACTACT GGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGT GTCCTCCGCCTCCACCAAGGGACCCT CCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGC AAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCTGCCCTGTGACAGTGTCCTG GAACTCCGGCGCTCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCA GTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCT CCGTCGTGACCGTGCCTTCCTCCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCA AAGTGGACAAGCGGGTGGAACCCAA GTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC

		CTCCCTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTG GGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC TCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGCCGTGTCCCACGAGG ATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAG TACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAAGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGC TCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGG CCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCA AGTGTACACACTGCCTCCCAGCCGGG AAGAGATGACCAAGAACCAAGTGTCC CTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTA CCCCTGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACT CCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC CTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 49	LCDR1 (Combinado)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 50	LCDR2 (Combinado)	YASQSIS
SEQ ID NO: 51	LCDR3 (Combinado)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 52	LCDR1 (Kabat)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 53	LCDR2 (Kabat)	YASQSIS
SEQ ID NO: 54	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 55	LCDR1 (Chothia)	SQSISNN
SEQ ID NO: 56	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 57	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 58	LCDR1 (IMGT)	QSISNN
SEQ ID NO: 59	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 60	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 61	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSI

		SNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFG VYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 62	DNA VL	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGC CACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGTGACCCTGTCCTGCCGGGCCTCC CAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC CCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTC CCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCA GATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCG TGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTAC TTCTGCCAGCAGTCCTCCTCCTGGCT GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAG
SEQ ID NO: 63	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSI SNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFG VYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 64	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGC CACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGA GAGTGACCCTGTCCTGCCGGGCCTCC CAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC CCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTC CCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCA GATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCG TGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTAC TTCTGCCAGCAGTCCTCCTCCTGGCT GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGC

		CAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACT TCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
674J13 (Humanizado, CysMab IAPA)		
SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Combinado)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 66	HCDR2 (Combinado)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 67	HCDR3 (Combinado)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 68	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 69	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 70	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 71	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 72	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 73	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 74	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 75	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 76	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 77	VH	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGY SITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHS SGSTNYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 78	DNA VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCC TGGCCTGGTCAAGCCCTCCCAGACCC TGTCCCTGACCTGCACCGTGTCCGGC TACTCTATCACCTCCGGCTACAGCTG GCACTGGATCCGGCAGCACCCCGGC AAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACAT CCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACA ACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCTCCCGGGACACCTCCAAGAACCA

		GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGA CCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTAC TGTGCCAGAGGCGGCGTGCAGGCCT TCGCTTATTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 79	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, CysMab)	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGY SITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHS SGSTNYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA L**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYP**C**DIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 80	Cadeia Pesada de DNA	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCC TGGCCTGGTCAAGCCCTCCCAGACCC TGTCCCTGACCTGCACCGTGTCCGGC TACTCTATCACCTCCGGCTACAGCTG GCACTGGATCCGGCAGCACCCCGGC AAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACAT CCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACA ACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCTCCCGGGACACCTCCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGA CCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTAC TGTGCCAGAGGCGGCGTGCAGGCCT TCGCTTATTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTGTCCTCCGCCAGCACCAA GGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCC CTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGC ACCGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAA

		GGACTACTTCCCCTGCCCCGTGACCG TGTCCTGGAACTCCGGCGCTCTGACC TCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGT GCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCC TGTCCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCC AGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCA ACACCAAAGTGGACAAGCGGGTGGAA CCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACAC CTGTCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGC TGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTG TTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCCA CGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAACAGTACAACTCCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCT GGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGA GCCCCAAGTGTACACACTGCCTCCCA GCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAA GTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGG CTTCTACCCCTGCGATATCGCCGTGG AGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTC CTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG
SEQ ID NO: 81	LCDR1 (Combinado)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 82	LCDR2 (Combinado)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 83	LCDR3 (Combinado)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 84	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH

SEQ ID NO: 85	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 86	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 87	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 88	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 89	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 90	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 91	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 92	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 93	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSS VIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLAS GVPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDA AVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 94	DNA VL	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGC CACCCTGTCCGCCTCTCCAGGCGAGC GCGTGACAATGTCCTGCTCCGCCTCC TCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTAT CAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTC GGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAG CTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATT CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACT ACACCCTGACCATCTCCAGCATGGAA CCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTG CCAGCAGTGGTCCTCCAACCCTCTGA CCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAA ATCAAG
SEQ ID NO: 95	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSS VIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLAS GVPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDA AVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 96	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGC CACCCTGTCCGCCTCTCCAGGCGAGC GCGTGACAATGTCCTGCTCCGCCTCC TCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTAT CAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTC GGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAG

		CTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATT CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACT ACACCCTGACCATCTCCAGCATGGAA CCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTG CCAGCAGTGGTCCTCCAACCCTCTGA CCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAA ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAG CGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCT ACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCG AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGG TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGA GCTTCAACAGGGGCGAGTGC

[00231] Outros anticorpos da invenção incluem aqueles em que os aminoácidos ou ácidos nucleicos que codificam os aminoácidos sofreram mutação, tendo, contudo, pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 de identidade percentual com as sequências descritas nas Tabelas 1 e 4. Em certas modalidades, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos foram mutados nas regiões variáveis quando comparados com as regiões variáveis representadas na sequência descrita nas Tabelas 1 e 4, retendo simultaneamente substancialmente a mesma atividade terapêutica que os anticorpos listados nas Tabelas 1 e 4.

[00232] Uma vez que cada um destes anticorpos se pode ligar a CCR7, as sequências de cadeia pesada de comprimento total e de cadeia leve de comprimento total VH, VL (sequências de aminoácidos e as sequências de nucleotídeos codificando as sequências de aminoácidos) podem ser "misturadas e correlacionadas" para criar outros anticorpos de ligação a CCR7 da invenção. Tais anticorpos de ligação a

CCR7 “misturados e correlacionados” podem ser testados usando os ensaios de ligação conhecidos na técnica (por exemplo, ELISA e outros ensaios descritos na seção de Exemplos). Quando essas cadeias são misturadas e correlacionadas, uma sequência VH de um emparelhamento VH/VL particular deve ser substituída por uma sequência VH estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência de cadeia pesada de comprimento total de um emparelhamento particular de cadeia pesada de comprimento total / cadeia leve de comprimento total deve ser substituída por uma sequência de cadeia pesada de comprimento total estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência VL de um emparelhamento VH/VL particular deve ser substituída por uma sequência VL estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência de cadeia leve de comprimento total de um emparelhamento particular de cadeia pesada de comprimento total / cadeia leve de comprimento total deve ser substituída por uma sequência de cadeia leve de comprimento total estruturalmente similar. Consequentemente, em um aspecto, a revelação fornece um anticorpo monoclonal isolado ou um seu fragmento de ligação ao antígeno possuindo: uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 13, 45, 77 e 608; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29, 61, 93 e 624; em que o anticorpo se liga especificamente a CCR7.

[00233] Em outro aspecto, a invenção fornece (i) um anticorpo monoclonal isolado possuindo: uma cadeia pesada de comprimento total compreendendo uma sequência de aminoácidos que foi otimizada para expressão na célula de um sistema de expressão de mamífero selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 15, 47, 79 e 610; e uma cadeia leve de comprimento total compreendendo uma se-

quência de aminoácidos que foi otimizada para expressão na célula de um mamífero selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31, 63, 95 e 626; ou (ii) uma proteína funcional compreendendo uma sua porção de ligação ao antígeno.

[00234] Em outro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos de ligação a CCR7 que compreendem as CDR1s, CDR2s e CDR3s de cadeia pesada e cadeia leve, conforme descrito nas Tabelas 1 e 4, ou combinações das mesmas. As sequências de aminoácidos das CDR1s VH dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 1, 4, 7, 10, 33, 36, 39, 42, 65, 68, 71 e 74. As sequências de aminoácidos das CDR2s VH dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 11, 34, 37, 40, 43, 66, 69, 72 e 75. As sequências de aminoácidos das CDR3s VH dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 12, 35, 38, 41, 44, 67, 70, 73 e 76. As sequências de aminoácidos das CDR1s VL dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 17, 20, 23, 26, 49, 52, 55, 58, 81, 84, 87 e 90. As sequências de aminoácidos das CDR2s VL dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 27, 50, 53, 56, 59, 82, 85, 88 e 91. As sequências de aminoácidos das CDR3s VL dos anticorpos são mostradas, por exemplo, nas SEQ ID NOs: 19, 22, 25, 28, 51, 54, 57, 60, 83, 86, 89 e 92.

[00235] Dado que cada um destes anticorpos pode se ligar a CCR7 e que especificidade de ligação ao antígeno é fornecida principalmente pelas regiões CDR1, 2 e 3, as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de VH e sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de VL podem ser "misturadas e correlacionadas" (ou seja, CDR de diferentes anticorpos podem ser misturados e correlacionados). Tais anticorpos de ligação a CCR7 “misturados e correlacionados” podem ser testados usando os ensaios de ligação conhecidos na técnica e os ensaios descritos em Exemplos (por exemplo, ELISA). Quando sequências de CDR VH são misturadas

e correlacionadas, a sequência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência VH particular deve ser substituída por uma sequência (ou sequências) de CDR estruturalmente similar. Similarmente, quando as sequências de CDR VL são misturadas e correlacionadas, a sequência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência VL particular deve ser substituída por uma sequência (ou sequências) de CDR estruturalmente similar. Será prontamente evidente para aquele de habilidade comum que sequências VH e VL inovadoras podem ser criadas substituindo-se uma ou mais sequências de região CDR VH e/ou VL por sequências estruturalmente similares das sequências de CDR mostradas no presente documento para anticorpos monoclonais da presente invenção.

[00236] Consequentemente, em certas modalidades, a presente invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado ou um seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma CDR1 de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1, 4, 7, 10, 33, 36, 39, 42, 65, 68, 71, 74, 596, 599, 602 e 605; uma CDR2 de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 11, 34, 37, 40, 43, 66, 69, 72, 75, 597, 600, 603 e 606; uma CDR3 de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 12, 35, 38, 41, 44, 67, 70, 73, 76, 598, 601, 604 e 607; uma CDR1 de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 17, 20, 23, 26, 49, 52, 55, 58, 81, 84, 87, 90, 612, 615, 618 e 621; uma CDR2 de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 27, 50, 53, 56, 59, 82, 85, 88, 91, 613, 616, 619 e 622; e uma CDR3 de cadeia leve que compreende uma

sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19, 22, 25, 28, 51, 54, 57, 60, 83, 86, 89, 92, 614, 617, 620 e 623; em que o anticorpo se liga especificamente a CCR7.

[00237] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:1, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:2; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:3; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:17; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:18; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:19.

[00238] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:4, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:5; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:6; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:20; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:21; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:22.

[00239] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:7, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:8; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:9; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:23; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:24; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:25.

[00240] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:10, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:11; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:12; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:26; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:27;

e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:28.

[00241] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:33, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:34; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:35; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:49; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:50; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:51.

[00242] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:36, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:37; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:38; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:52; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:53; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:54.

[00243] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:39, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:40; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:41; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:55; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:56; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:57.

[00244] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:42, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:43; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:44; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:58; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:59; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:60.

[00245] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento

de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:65, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:66; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:67; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:81; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:82; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:83.

[00246] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:68, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:69; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:70; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:84; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:85; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:86.

[00247] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:71, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:72; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:73; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:87; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:88; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:89.

[00248] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO:74, uma CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO:75; uma CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO:76; uma CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO:90; uma CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO:91; e uma CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO:92.

[00249] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de ca-

deia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:596, uma HCDR2 de SEQ ID NO:597 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:598; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:612, uma LCDR2 de SEQ ID NO:613 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:614.

[00250] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:599, uma HCDR2 de SEQ ID NO:600 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:601; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:615, uma LCDR2 de SEQ ID NO:616 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:617.

[00251] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:602, uma HCDR2 de SEQ ID NO:603 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:604; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:618, uma LCDR2 de SEQ ID NO:619 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:620.

[00252] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:605, uma HCDR2 de SEQ ID NO:606 e uma HCDR3 de SEQ ID NO:607; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:621, uma LCDR2 de SEQ ID NO:622 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:623.

[00253] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmen-

to de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29.

[00254] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61.

[00255] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93.

[00256] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:608, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:624.

[00257] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31.

[00258] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento

de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63.

[00259] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95.

[00260] Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se liga especificamente a CCR7 compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:610, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:626.

[00261] Em certas modalidades, um anticorpo que se liga especificamente a CCR7 é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) que é descrito nas Tabelas 1 e 4.

1. Identificação de Epitopos e Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epitopo

[00262] A presente invenção também fornece anticorpos e fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam especificamente ao mesmo epitopo que os anticorpos anti-CCR7 descritos nas Tabelas 1 e 4, ou competem de forma cruzada com os anticorpos descritos nas Tabelas 1 e 4. Anticorpos adicionais e fragmentos de anticorpo adicionais (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) podem assim ser identificados com base na sua ca-

pacidade para competir de forma cruzada (por exemplo, para inibir competitivamente a ligação de, de forma estatisticamente significativa) com outros anticorpos da invenção em ensaios de ligação de CCR7, por exemplo, via BIACORE ou ensaios conhecidos de peritos na técnica para medir a ligação. A capacidade de um anticorpo de teste inibir a ligação de anticorpos e fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) da presente invenção a um CCR7 (por exemplo, CCR7 humano) demonstra que o anticorpo de teste pode competir com aquele anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) quanto a ligação a CCR7; um tal anticorpo pode, de acordo com a teoria não limitativa, se ligar ao mesmo epitopo ou a um epitopo relacionado (por exemplo, um epitopo com estrutura semelhante ou espacialmente próximo ou sobreposto) na proteína CCR7 como o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) com o qual compete. Em certas modalidades, os anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo em CCR7 como os anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) descritos nas Tabelas 1 e 4 são anticorpos monoclonais humanos ou humanizados. Tais anticorpos monoclonais humanos ou humanizados podem ser preparados e isolados conforme descrito no presente documento.

2. Alteração Adicional da *Framework* da Região Fc

[00263] Os imunoconjugados da invenção podem compreender anticorpos modificados ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que compreendem adicionalmente modificações a resíduos de *framework* dentro de VH e/ou VL, por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Em certas modalidades, as modificações de *framework* são feitas para reduzir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é "mutação reversa" de um ou mais resíduos de *framework* para a sequência de linhagem germinativa correspondente. Mais es-

pecificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de *framework* que diferem da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo deriva. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se as sequências de *framework* de anticorpo com as sequências de linhagem germinativa das quais o anticorpo deriva. Para devolver as sequências de região de *framework* à sua configuração de linhagem germinativa, as mutações somáticas podem sofrer "mutação reversa" para a sequência de linhagem germinativa, por exemplo, por mutagênese dirigida ao local. Tais anticorpos “com mutação reversa” são também destinados a serem abrangidos pela invenção.

[00264] Outro tipo de modificação de *framework* envolve realizar mutação de um ou mais resíduos dentro da região de *framework* ou mesmo dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover epitopos de célula T para, assim, reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Essa abordagem é também denominada "desimunização" e é descrita em maior detalhe na Publicação de Patente nº 20030153043 de Carr *et al.*

[00265] Adicionalmente, ou em alternativa, às modificações feitas dentro das regiões de *framework* ou de CDR, os anticorpos da invenção podem ser manipulados para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação de receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno (ADCC). Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem ser fixadas ao anticorpo) ou ser modificadas para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas modalidades é descrita em maior detalhe abaixo.

[00266] Em uma modalidade, a região de dobradiça de CH1 é modi-

ficada de modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça seja alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Essa abordagem é descrita adicionalmente na Patente nº U.S. 5.677.425 por Bodmer *et al.* O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça de CH1 é alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

[00267] Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo revelado no presente documento inclui resíduos de aminoácido modificados ou geneticamente modificados, por exemplo, um ou mais resíduos de cisteína, como locais para a conjugação de uma porção de fármaco (Junutula JR, *et al.*, Nat Biotechnol 2008, 26:925-932). Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado que compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos por cisteína nas posições descritas no presente documento. Locais para substituição de cisteína estão nas regiões constantes do anticorpo ou fragmento de anticorpo e são, assim, aplicáveis a uma variedade de anticorpo ou fragmento de anticorpo, e os locais são selecionados para fornecer conjugados estáveis e homogêneos. Um anticorpo ou fragmento modificado pode ter uma, duas ou mais substituições de cisteína, e essas substituições podem ser usadas em combinação com outros métodos de modificação e conjugação conforme descrito no presente documento. Métodos para inserir cisteína em localizações específicas de um anticorpo são conhecidos na técnica, consultar, por exemplo, Lyons *et al*, (1990) Protein Eng., 3:703-708, WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. Em determinadas modalidades, um anticorpo modificado compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos por cisteína na sua região constante selecionada dentre as posições 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207,

246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 e 422 de uma cadeia pesada do anticorpo, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos por cisteína em sua região constante selecionada dentre as posições 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, e 203 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve kappa humana. Em determinadas modalidades, um anticorpo ou seu fragmento de anticorpo modificado compreende uma combinação de substituição de dois ou mais aminoácidos por cisteína em suas regiões constantes, em que as combinações compreendem substituições nas posições 375 de uma cadeia pesada de anticorpo, posição 152 de uma cadeia pesada de anticorpo, posição 360 de uma cadeia pesada de anticorpo ou posição 107 de uma cadeia leve de anticorpo e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU. Em certas modalidades, um anticorpo ou seu fragmento de anticorpo modificado compreende uma substituição de um aminoácido por cisteína nas suas regiões constantes, em que a substituição é na posição 375 de uma cadeia pesada de anticorpo, posição 152 de uma cadeia pesada de anticorpo, posição 360 de uma cadeia pesada de anticorpo, posição 107 de uma cadeia leve de anticorpo, posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo ou posição 159 de uma cadeia leve de anticorpo e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia kappa. Em modalidades particulares, um anticorpo ou seu fragmento de anticorpo modificado compreende uma combinação de substituição de dois aminoácidos por cisteína em suas regiões constantes,

em que as combinações compreendem substituições nas posições 375 de uma cadeia pesada de anticorpo e posição 152 de uma cadeia pesada de anticorpo, em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU. Em modalidades particulares, um anticorpo ou seu fragmento de anticorpo modificado compreende uma substituição de um aminoácido por uma cisteína na posição 360 de uma cadeia pesada de anticorpo, em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU. Em outras modalidades particulares, um anticorpo ou seu fragmento de anticorpo modificado compreende uma substituição de um aminoácido por cisteína na posição 107 de uma cadeia leve de anticorpo e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU e em que a cadeia leve é uma cadeia kappa.

[00268] Em modalidades adicionais, anticorpos ou fragmentos (por exemplo, fragmento de anticorpo) úteis em imunoconjugados da invenção incluem anticorpos modificados ou geneticamente manipulados, tal como um anticorpo modificado para introduzir um ou mais outros aminoácidos reativos (que não cisteína), incluindo Pcl, pirrolisina, etiquetas peptídicas (tal como etiquetas S6, A1 e ybbR), e aminoácidos não naturais, em vez de pelo menos um aminoácido da sequência nativa, assim fornecendo um local reativo no anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno para conjugação com uma porção de fármaco de uma porção de ligante-fármaco com reatividade complementar. Por exemplo, os anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser modificados para incorporar Pcl ou pirrolisina (W. Ou, *et al.*, (2011) PNAS 108 (26), 10437-10442; WO2014124258) ou aminoácidos não naturais (J.Y. Axup, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012), páginas 16101–16106; para revisão, consultar C.C. Liu and P.G. Schultz (2010) Annu Rev Biochem 79, 413-444; C.H. Kim, *et al.*, (2013) Curr Opin Chem Biol. 17, 412-419) como locais para conjugação com um fármaco. Similarmente, etiquetas peptídicas para métodos de conjuga-

ção enzimática podem ser introduzidos em um anticorpo (Strop P., *et al.*, Chem Biol. 2013, 20(2):161-7; Rabuka D., Curr Opin Chem Biol. Dezembro de 2010;14(6):790-6; Rabuka D, *et al.*, Nat Protoc. 2012, 7(6):1052-67). Um outro exemplo é o uso de 4'-fosfopanteteinil transferases (PPTase) para a conjugação de análogos de Co-enzima A (WO2013184514), e (Grünewald *et al., (2015)* Bioconjugate Chem. 26 (12), 2554-62). Métodos para conjugar tais anticorpos modificados ou geneticamente manipulados com combinações de cargas úteis ou de ligante-carga útil são conhecidos da técnica.

[00269] Em outra modalidade, a região de dobradiça Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácidos são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento de dobradiça Fc de modo que o anticorpo tenha ligação comprometida de proteína estafilocócica A (SpA) em relação a ligação de SpA de domínio de dobradiça Fc. Essa abordagem é descrita em maior detalhe na Patente U.S. Nº 6,165,745 de Ward *et al.*

[00270] Ainda em outras modalidades, a região Fc é alterada substituindo pelo menos um resíduo de aminoácido por um diferente resíduo de aminoácido para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos por um diferente resíduo de aminoácido de modo que o anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligante efetor, mas retendo a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo original. O ligante efetor para o qual é alterada a afinidade pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. Nº 5,624,821 e 5,648,260, ambas de Winter *et al.*

[00271] Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados a partir de resíduos de aminoácidos podem ser substituídos por

um diferente resíduo de aminoácido, de modo que o anticorpo tenha ligação C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) reduzida ou suprimida. Esta abordagem é descrita, por exemplo, na Patente U.S. Nº 6,194,551 de Idusogie *et al.*

[00272] Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácidos são alterados para assim alterar a capacidade do anticorpo de corrigir o complemento. Esta abordagem está descrita, por exemplo, na Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.* Resíduos de aminoácidos alotípicos incluem, mas não se limitam a, região constante de uma cadeia pesada das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 bem como região constante de uma cadeia leve do isótipo kappa, como descrito por Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

[00273] Complexos de proteína de fusão de anticorpo que contêm tais mutações medeiam citotoxicidade celular dependente de anticorpo reduzida ou inexistente (ADCC) ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em certas modalidades, os resíduos de aminoácidos L234 e L235 da região constante IgG1 são substituídos por A234 e A235. Em certas modalidades, o resíduo de aminoácido N267 da região constante IgG1 é substituído por A267. Em certas modalidades, os resíduos de aminoácidos D265 e P329 da região constante IgG1 são substituídos por A265 e A329. Em certas modalidades, uma cadeia pesada de imunoglobulina compreende opcionalmente uma mutação ou combinação de mutações que conferem função efetora reduzida selecionada a partir de qualquer uma de D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A e P329G/L234A/L235A. Em modalidades particulares, um imunoconjugado compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo uma mutação ou combinação de mutações que conferem função efetora reduzida selecionada a partir de qualquer uma de D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/

L234A/L235A e P329G/L234A/L235A.

[00274] Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácidos são alterados para assim alterar a capacidade do anticorpo de corrigir o complemento. Esta abordagem é descrita, por exemplo, na Publicação PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* Em uma modalidade específica, um ou mais aminoácidos de um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da presente invenção são substituídos por um ou mais resíduos de aminoácidos alotípicos. Resíduos de aminoácidos alotípicos também incluem, mas não se limitam, à região constante da cadeia pesada das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3, bem como à região constante da cadeia leve do isótipo kappa, como descrito por Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

[00275] Ainda em outra modalidade, é modificada a glicosilação de um anticorpo. Por exemplo, pode ser feito um anticorpo aglicosilado (ou seja, o anticorpo carece de glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo para "antígeno". Tais modificações de carboidrato podem ser alcançadas, por exemplo, por alteração de um ou mais locais de glicosilação dentro da sequência do anticorpo. Por exemplo, podem ser feitas uma ou mais substituições de aminoácidos que resultem na eliminação de um ou mais locais de glicosilação de *framework* de região variável para assim eliminar glicosilação nesse local. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para antígeno. Tal abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. Nº 5,714,350 and 6,350,861 de Co *et al.*

[00276] Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar a sua meia-vida biológica. São possíveis várias abordagens. Por exemplo, podem ser introduzidas uma ou mais das seguintes mutações: T252L, T254S, T256F, como descrito na Patente U.S. Nº 6,277,375 de Ward. Em alternativa, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou CL para

conter um epitopo de ligação ao receptor de salvamento retirado de duas alças de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas Patentes U.S. Nº 5,869,046 e 6,121,022 de Presta *et al.*

3. Produção dos Anticorpos CCR7

[00277] Anticorpos anti-CCR7 e seus fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) podem ser produzidos por quaisquer meios conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, expressão recombinante, síntese química e digestão enzimática de tetrâmeros de anticorpos, enquanto os anticorpos monoclonais de comprimento total podem ser obtidos, por exemplo, por hibridoma ou produção recombinante. A expressão recombinante pode ser de quaisquer células hospedeiras conhecidas na técnica, por exemplo, células hospedeiras de mamífero, células hospedeiras de bactérias, células hospedeiras de leveduras, células hospedeiras de insetos, etc.

[00278] A invenção fornece ainda polinucleotídeos que codificam os anticorpos aqui descritos, por exemplo, polinucleotídeos que codificam regiões de cadeia pesada ou leve ou segmentos que compreendem regiões determinantes de complementaridade como aqui descrito. Em certas modalidades, o polinucleotídeo que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada tem, pelo menos, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de ácidos nucleicos com um polinucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 14, 46, 78 e 609. Em certas modalidades, o polinucleotídeo que codifica as regiões variáveis de cadeia leve tem, pelo menos, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de ácidos nucleicos com um polinucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 30, 62, 94 e 625.

[00279] Em certas modalidades, o polinucleotídeo que codifica a

cadeia pesada tem, pelo menos, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de ácidos nucleicos com um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 16, 48, 80 ou 611. Em certas modalidades, o polinucleotídeo que codifica a cadeia leve tem, pelo menos, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de ácidos nucleicos com um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 32, 64, 96 ou 627.

[00280] Os polinucleotídeos da invenção podem codificar apenas a sequência de região variável de um anticorpo anti-CCR7. Os mesmos podem também codificar tanto uma região variável quanto uma região constante do anticorpo. Algumas das sequências de polinucleotídeos codificam um polipeptídeo que compreende regiões variáveis tanto de uma cadeia pesada quanto de uma cadeia leve de um dos anticorpos anti-CCR7 de camundongo exemplificados. Alguns outros polinucleotídeos codificam dois segmentos de polipeptídeos que, respectivamente, são substancialmente idênticos às regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve de um dos anticorpos de camundongo.

[00281] As sequências de polinucleotídeos podem ser produzidas por síntese de DNA de fase sólida *de novo* ou por mutagênese por PCR de uma sequência existente (por exemplo, sequências conforme descritas nos Exemplos abaixo) que codifica um anticorpo anti-CCR7 ou seu fragmento de ligação. A síntese química direta de ácidos nucleicos pode ser realizada pelos métodos conhecidos na técnica, tal como o método de fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90, 1979; o método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; o método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22:1859, 1981; e o método de suporte sólido da Patente nº U.S. 4.458.066. A introdução de mutações a uma sequência de polinucleotídeos por PCR pode ser realizada conforme descrito em, por

exemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; e Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[00282] A invenção também fornece vetores de expressão e células hospedeiras para produzir os anticorpos anti-CCR7 acima descritos. Vários vetores de expressão podem ser empregados para expressar os polinucleotídeos que codificam as cadeias de anticorpo anti-CCR7 ou fragmentos de ligação. Vetores de expressão com base viral ou não virais podem ser usados para produzir os anticorpos em uma célula hospedeira de mamífero. Sistemas e vetores não virais incluem plasmídeos, vetores episssômicos, tipicamente com um cassete de expressão para expressar uma proteína ou RNA, e cromossomos artificiais humanos (consultar, por exemplo, Harrington *et al.*, Nat Genet 15:345, 1997). Por exemplo, vetores não virais úteis para expressão dos polinucleotídeos e polipeptídeos anti-CCR7 em células de mamíferos (por exemplo, seres humanos) incluem pThioHis A, B & C, pcDNA^{TM}3.1/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, San Diego, CA), vetores MPSV e inúmeros outros vetores conhecidos na técnica para expressar outras proteínas. Os vetores virais úteis incluem vetores com base em retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados, herpes vírus, vetores com base em SV40, papilomavírus, vírus Epstein Barr HBP, vetores de vírus da vaccínia e vírus Semliki Forest (SFV). Consultar, Brent *et al.*, *supra*; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; e Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

[00283] A escolha do vetor de expressão depende das células hospedeiras pretendidas nas quais o vetor deve ser expresso. Tipicamente, os vetores de expressão contêm um promotor e outras sequências reguladoras (por exemplo, intensificadores) que são ligadas de maneira funcional aos polinucleotídeos que codificam uma cadeia ou frag-

mento de anticorpo anti-CCR7. Em certas modalidades, um promotor induzível é empregado para evitar a expressão de sequências inseridas exceto sob condições indutoras. Os promotores induzíveis incluem, por exemplo, arabinose, lacZ, promotor de metalotioneína ou um promotor de choque térmico. As culturas de organismos transformados podem ser expandidas sob condições não indutoras sem polarizar as sequências de codificação cujos produtos de expressão são melhor tolerados pelas células hospedeiras. Adicionalmente aos promotores, outros elementos reguladores podem também ser exigidos ou desejados para expressão eficiente de uma cadeia ou fragmento de anticorpo anti-CCR7. Esses elementos incluem tipicamente um códon de iniciação de ATG e local de ligação a ribossomo adjacente ou outras sequências. Adicionalmente, a eficiência da expressão pode ser intensificada pela inclusão de intensificadores apropriados para o sistema de célula em uso (consultar, por exemplo, Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; e Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por exemplo, o intensificador de SV40 ou intensificador de CMV pode ser usado para aumentar a expressão em células hospedeiras de mamíferos.

[00284] Os vetores de expressão podem também fornecer uma posição de sequência de sinal de secreção para formar uma proteína de fusão com polipeptídeos codificados por sequências de anticorpo anti-CCR7 inseridas. Mais frequentemente, as sequências de anticorpo anti-CCR7 inseridas são ligadas a uma sequência de sinal antes da inclusão no vetor. Os vetores a serem usados para receber sequências que codificam domínios variáveis de cadeia leve e pesada de anticorpo anti-CCR7 também codificam, por vezes, regiões constantes ou partes das mesmas. Tais vetores permitem a expressão das regiões variáveis como proteínas de fusão com as regiões constantes levando, assim, à produção de anticorpos intactos ou fragmentos dos mesmos.

Tipicamente, tais regiões constantes são humanas.

[00285] As células hospedeiras para abrigar e expressar as cadeias de anticorpo anti-CCR7 podem ser procarióticas ou eucarióticas. *E. coli* é um hospedeiro procariótico útil para clonar e expressar os polinucleotídeos da presente invenção. Outros hospedeiros microbianos adequados para uso incluem bacilos, tais como *Bacillus subtilis* e outras enterobacteriaceae, tais como *Salmonella, Serratia* e várias espécies de *Pseudomonas*. Nesses hospedeiros procarióticos, podem também ser produzidos vetores de expressão, que contêm tipicamente sequências de controle de expressão compatíveis com a célula hospedeira (por exemplo, uma origem de replicação). Adicionalmente, qualquer número dentre uma variedade de promotores bem conhecidos estará presente, tal como o sistema promotor de lactose, um sistema promotor de triptofano (trp), um sistema promotor de beta-lactamase ou um sistema promotor de fago lambda. Os promotores controlam tipicamente a expressão, opcionalmente com uma sequência operadora, e têm sequências de local de ligação a ribossomo e similares, para iniciar e concluir a transcrição e a tradução. Outros micróbios, tais como levedura, podem também ser empregados para expressar polipeptídeos anti-CCR7 da invenção. Podem também ser usadas células de inseto em combinação com vetores de baculovírus.

[00286] Em certas modalidades preferidas, células hospedeiras de mamífero são usadas para expressar e produzir os polipeptídeos anti-CCR7 da presente invenção. Por exemplo, as mesmas podem ser ou uma linhagem de células de hibridoma que expressa genes de imunoglobulina endógenos (por exemplo, os clones de hibridoma de mieloma conforme descritos nos Exemplos) ou uma linhagem de células de mamífero que abriga um vetor de expressão exógeno (por exemplo, as células de mieloma SP2/0 exemplificadas abaixo). As mesmas incluem qualquer célula humana ou animal mortal normal ou normal ou imortal

anormal. Por exemplo, foram desenvolvidas várias linhagens de células hospedeiras adequadas com a capacidade de secretar imunoglobulinas intatas, incluindo as linhagens de células CHO, várias linhagens de células Cos, células HeLa, linhagens de células de mieloma, células B transformadas e hibridomas. O uso de cultura celular de tecido de mamífero para expressar polipeptídeos é discutido genericamente em, por exemplo, Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Os vetores de expressão para células hospedeiras de mamífero podem incluir sequências de controle de expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor e um intensificador (ver, por exemplo, Queen *et al.*, Immunol. Rev. 89:49 a 68, 1986), e locais de informações de processamento necessários, tais como locais de ligação a ribossomo, locais de *splicing* de RNA, locais de poliadenilação e sequências terminadoras transcricionais. Esses vetores de expressão normalmente contêm promotores derivados de genes de mamíferos ou de vírus de mamíferos. Os promotores adequados podem ser constitutivos, específicos para tipo de célula, específicos para estágio e/ou moduláveis ou reguláveis. Os promotores úteis incluem, porém sem limitação, o promotor de metalotioneína, o promotor tardio principal de adenovírus constitutivo, o promotor de MMTV induzível por dexametasona, o promotor de SV40, o promotor de MRP polIII, o promotor de MPSV constitutivo, o promotor de CMV induzível por tetraciclina (tal como o promotor de CMV precoce imediato humano), o promotor de CMV constitutivo e combinações de promotor-intensificador conhecidas na técnica.

[00287] Os métodos para introduzir vetores de expressão contendo as sequências de polinucleotídeos de interesse variam dependendo do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, a transfecção de cloreto de cálcio é comumente utilizada para células procarióticas, enquanto o tratamento com fosfato de cálcio ou eletroporação pode ser usado pa-

ra outros hospedeiros celulares (consultar, de modo geral, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4ª ed.). Outros métodos incluem, por exemplo, eletroporação, tratamento com fosfato de cálcio, transformação mediada por lipossoma, injeção e microinjeção, métodos balísticos, virossomas, imunolipossomas, conjugados de policátion:ácido nucleico, DNA nu, vírions artificiais, fusão à proteína estrutural do herpes vírus VP22 (Elliot e O'Hare, Cell 88:223, 1997), absorção de DNA intensificada por agente e transdução *ex vivo*. Para produção de alto rendimento a longo prazo de proteínas recombinantes, a expressão estável será frequentemente desejada. Por exemplo, linhagens celulares que expressam estavelmente cadeias de anticorpo ou fragmentos de ligação anti-CCR7 podem ser preparadas usando vetores de expressão da invenção que contêm origens virais de replicação ou elementos de expressão endógenos e um gene marcador selecionável. Após a introdução do vetor, as células podem ser deixadas proliferar por 1 a 2 dias em um meio enriquecido antes de serem trocadas para meios seletivos. O propósito do marcador selecionável é conferir resistência à seleção, e sua presença permite a proliferação de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas em meios seletivos. Células resistentes estavelmente transfectadas podem ser proliferadas com o uso de técnicas de cultura de tecido adequadas para o tipo de célula.

Usos Terapêuticos

[00288] Os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e conjugados de anticorpo e fármaco da invenção são úteis em uma variedade de aplicações, incluindo, mas não limitado a, tratamento ou prevenção de câncer, tais como cânceres sólidos ou neoplasias hematológicas. Em certas modalidades, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e conjugados de anticorpo e fármaco da invenção

são úteis para inibir o crescimento do tumor, induzir diferenciação, reduzir o volume do tumor e/ou reduzir a tumorigenicidade de um tumor. Os métodos a utilizar podem ser métodos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

[00289] Em um aspecto, os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e conjugados de anticorpo e fármaco da invenção são úteis para detectar a presença de CCR7 em uma amostra biológica. O termo "detectar" como usado neste documento abrange a detecção quantitativa ou qualitativa. Em certas modalidades, uma amostra biológica compreende uma célula ou tecido. Em certas modalidades, tais tecidos incluem tecidos normais e/ou cancerígenos que expressam CCR7 em níveis mais elevados relativamente a outros tecidos.

[00290] Em um aspecto, a invenção fornece um método de detectar a presença de CCR7 em uma amostra biológica. Em certas modalidades, o método compreende colocar em contato a amostra biológica com um anticorpo anti-CCR7 sob condições que permitem a ligação do anticorpo ao antígeno e detectar se um complexo é formado entre o anticorpo e o antígeno.

[00291] Em um aspecto, a invenção fornece um método para diagnosticar um distúrbio associado à expressão aumentada de CCR7. Em certas modalidades, o método compreende colocar em contato uma célula de teste com um anticorpo anti-CCR7; determinar o nível de expressão (quantitativa ou qualitativamente) de CCR7 na célula de teste pela detecção de ligação do anticorpo anti-CCR7 ao antígeno CCR7; e comparar o nível de expressão do CCR7 na célula de teste com o nível de expressão de CCR7 em uma célula de controle (por exemplo, uma célula normal com a mesma origem de tecido da célula de teste ou uma célula que expressa CCR7 a níveis comparáveis com uma tal célula normal), onde um nível superior de expressão de CCR7 na célula de ensaio, em comparação com a célula de controle, indica a pre-

sença de um distúrbio associado com o aumento da expressão de CCR7. Em certas modalidades, a célula de teste é obtida a partir de um indivíduo suspeito de ter um distúrbio associado com aumento da expressão de CCR7. Em certas modalidades, o distúrbio é uma desordem proliferativa celular, tal como um câncer ou um tumor. Em certas modalidades, o método compreende a medição do número de cópia do gene CCR7 em uma célula de teste.

[00292] Em certas modalidades, um método de diagnóstico ou detecção, tal como os descritos acima, compreende a detecção de ligação de um anticorpo anti-CCR7 a CCR7 expressa na superfície de uma célula ou em uma preparação de membrana obtida a partir de uma célula exprimindo CCR7 na sua superfície. Um exemplo de ensaio para detecção de ligação de um anticorpo anti-CCR7 a CCR7 expressa na superfície de uma célula é um ensaio "FACS".

[00293] Certos outros métodos podem ser usados para detectar ligação dos anticorpos anti-CCR7 a CCR7. Tais métodos incluem, mas não se limitam a, ensaios de ligação ao antígeno que são bem conhecidos na técnica, como transferências de Western, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima), imunoensaios "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A e imuno-histoquímica (IHC).

[00294] Em certas modalidades, são etiquetados anticorpos anti-CCR7. As etiquetas incluem, mas não se limitam a, etiquetas ou porções que são detectadas diretamente (tais como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas em termos de elétrons, quimioluminescentes e radioativas), bem como porções, tais como enzimas ou ligantes, que são detectadas indiretamente, por exemplo, através de uma reação enzimática ou interação molecular.

[00295] Em certas modalidades, anticorpos anti-CCR7 são imobilizados em uma matriz insolúvel. Imobilização implica separar o anticor-

po anti-CCR7 de qualquer proteína CCR7 que permanece livre na solução. Esta é realizada convencionalmente insolubilizando o anticorpo anti-CCR7 antes do procedimento de ensaio, tal como por adsorção para uma matriz ou superfície insolúvel em água (Bennich et al., Patente U.S. Nº 3,720,760), ou por ligação covalente (por exemplo, usando reticulação de glutaraldeído), ou por insolubilização do anticorpo anti-CCR7 após a formação de um complexo entre o anticorpo anti-CCR7 e a proteína CCR7, por exemplo, por imunoprecipitação.

[00296] Qualquer uma das modalidades de diagnóstico ou detecção pode ser realizada utilizando um imunoconjugado da invenção em lugar, ou além, de um anticorpo anti-CCR7.

[00297] Em uma modalidade, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de uma doença compreendendo administrar os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção a um paciente. A invenção também fornece a utilização dos anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção para o tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente. Em certas modalidades, a invenção fornece anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção para utilização no tratamento ou prevenção da doença em um paciente. Em outras modalidades, a invenção fornece a utilização de anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção no fabrico de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doença em um paciente.

[00298] Em certas modalidades, a doença tratada com os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e conjugados de anticorpo e fármaco da invenção é um cân-

cer. Em certas modalidades, o câncer é caracterizado por células expressando CCR7 aos quais os anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) e conjugados de anticorpo e fármaco da invenção se ligam. Em certas modalidades, o câncer se caracteriza por um aumento na expressão de CCR7 em relação a um paciente saudável. Em certas modalidades, a expressão de CCR7 pode ser medida por um aumento em RNA CCR7. Em outras modalidades, o câncer se caracteriza por um aumento no número de cópias de DNA de CCR7. Outros métodos de medir ou determinar níveis de expressão de CCR7 são conhecidos dos entendidos na técnica. Exemplos de doenças que podem ser tratadas e/ou prevenidas incluem, mas não se limitam a, leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), carcinoma gástrico, câncer do pulmão de células não pequenas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer da cabeça e do pescoço, carcinoma nasofaríngeo (NPC), câncer do esôfago, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer da tireoide, câncer da mama, câncer de células renais e câncer do colo do útero.

[00299] A presente invenção fornece métodos de tratamento ou prevenção do câncer compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção. Em certas modalidades, o câncer é um câncer sólido. Em certas modalidades, o sujeito é um humano. Em certas modalidades, o câncer é um câncer resistente e/ou câncer recidivado. Em certos aspectos, por exemplo, o câncer resistente é resistente a inibidores da tirosina quinase, inibidores de EGFR, inibidores

Her2, inibidores Her3, inibidores de IGFR e inibidores de Met.

[00300] Em certas modalidades, a invenção fornece métodos de inibir o crescimento tumoral compreendendo administrar a um sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção. Em certas modalidades, o sujeito é um humano. Em certas modalidades, o sujeito tem um tumor ou foi submetido à cirurgia de remoção de tumor. Em certas modalidades, o tumor é resistente a outros inibidores da tirosina quinase, incluindo, mas não se limitando a, inibidores de EGFR, inibidores Her2, inibidores Her3, inibidores de IGFR e inibidores Met.

[00301] Em certas modalidades, o tumor expressa o CCR7 ao qual o anticorpo anti-CCR7 se liga. Em certas modalidades, o tumor sobreexpressa CCR7 humano. Em certas modalidades, o tumor tem um aumento do número de cópias do gene CCR7.

[00302] A presente invenção também fornece métodos de seleção de pacientes para tratamento com anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da invenção, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz dos referidos anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco. Em certos aspectos, o método compreende a seleção de pacientes com um câncer resistente ao inibidor de tirosina quinase. Em certos aspectos, é previsto que o câncer resistente ao inibidor de tirosina quinase seja resistente a inibidores de EGFR, inibidores Her2, inibidores Her3, inibidores de IGFR e/ou inibidores Met. Em certos aspectos, é previsto que o câncer resistente seja um câncer resistente Her2. Em certos aspectos, é previsto que o câncer seja um câncer resistente *de novo* e, ainda em outros aspectos, é previsto que o câncer seja um câncer recidivado. Em certos aspectos

da invenção, os métodos incluem a seleção de um paciente com um câncer resistente ou recidivado *de novo* e medição da expressão de CCR7. É previsto que, em certos aspectos, o cancro ou tumor recidivado não tenha sido inicialmente um cancro ou tumor expressando CCR7, mas se tenha tornado um câncer CCR7 positivo que é um câncer ou tumor recidivado resistente a tirosina quinase após o tratamento com inibidores da tirosina quinase.

[00303] Para o tratamento ou prevenção da doença, a dosagem apropriada dos anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco da presente invenção depende de vários fatores, tal como o tipo de doença a ser tratada, a gravidade e o curso da doença, a resposta da doença, terapia anterior, história clínica do paciente, e assim por diante. O anticorpo ou agente podem ser administrados uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos com duração de vários dias a vários meses, ou até alcançar a cura ou uma diminuição do estado da doença (por exemplo, redução do tamanho do tumor). Esquemas posológicos ideais podem ser calculados a partir de medições de acúmulo de fármaco no organismo do paciente e variam de acordo com a potência relativa de um anticorpo individual, fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) ou conjugados de anticorpo e fármaco. O médico assistente pode avaliar as taxas de repetição para a dosagem com base em tempos de residência e concentrações do fármaco em tecidos ou fluidos corporais.

Terapia de Combinação

[00304] Em certos casos, um anticorpo, fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) ou conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção são combinados com outros agentes terapêuticos, tais como outros agentes anticancerígenos, agentes antialérgicos, agentes antináusea (ou antieméticos), analgésicos,

agentes citoprotetores e suas combinações.

[00305] Em uma modalidade, um anticorpo, fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) ou conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção é combinado em uma formulação de combinação farmacêutica, ou regime de dosagem como terapia de combinação, com um segundo composto tendo propriedades anticancerígenas. O segundo composto da formulação de combinação farmacêutica ou regime de dosagem pode ter atividades complementares ao anticorpo ou imunoconjugado da combinação de modo que as mesmas não afetem adversamente uma à outra. Por exemplo, um anticorpo, fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento de ligação ao antígeno) ou conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção podem ser administrados em combinação com, mas não se limitando a, um agente quimioterapêutico, um inibidor de tirosina quinase, um inibidor da via de sinalização a jusante de CCR7, inibidores de IAP, inibidores de BCL2, inibidores de MCL1 e outros inibidores de CCR7.

[00306] O termo "combinação farmacêutica" conforme usado no presente documento refere-se a uma combinação fixa em uma forma unitária de dosagem ou combinação não fixa ou um kit de partes da administração combinada em que dois ou mais agentes terapêuticos podem ser administrados independentemente ao mesmo tempo ou separadamente dentro de intervalos de tempo, especialmente onde esses intervalos de tempo permitem que os parceiros de combinação mostrem um efeito cooperativo, por exemplo, sinérgico.

[00307] O termo "terapia de combinação" refere-se à administração de dois ou mais agentes terapêuticos para tratar ou prevenir uma afecção ou distúrbio terapêutico descrito na presente revelação. Tal administração engloba a coadministração destes agentes terapêuticos de um modo substancialmente simultâneo, tal como em uma cápsula única tendo uma razão fixa de ingredientes ativos. Alternativamente,

tal administração engloba a coadministração em recipientes múltiplos ou separados (por exemplo, cápsulas, pós e líquidos) para cada ingrediente ativo. Pós e/ou líquidos podem ser reconstituídos ou diluídos até uma dose desejada antes da administração. Adicionalmente, tal administração engloba também uso de cada tipo de agente terapêutico de um modo sequencial, aproximadamente ao mesmo tempo ou em diferentes momentos. Em qualquer dos casos, o regime de tratamento proporcionará efeitos benéficos da combinação de fármacos no tratamento ou prevenção das condições ou distúrbios descritos aqui.

[00308] A terapia de combinação pode fornecer "sinergia" e se mostra "sinérgica", isto é, o efeito alcançado quando os ingredientes ativos usados em conjunto são maiores do que a soma dos efeitos que resultam do uso dos compostos separadamente. Um efeito sinérgico pode ser alcançado quando os ingredientes ativos são: (1) coformulados e administrados ou entregues simultaneamente em uma formulação de dosagem unitária combinada; (2) entregues por alternação ou em paralelo como formulações separadas; ou (3) por algum outro regime. Quando entregue na terapia de alternação, um efeito sinérgico pode ser alcançado quando os compostos são administrados ou entregues sequencialmente, por exemplo, por injeções diferentes em seringas separadas. Em geral, durante a terapia de alternação, uma dosagem eficaz de cada ingrediente ativo é administrada sequencialmente, isto é, em série, enquanto na terapia de combinação, dosagens eficazes de dois ou mais ingredientes ativos são administradas em conjunto.

[00309] Os agentes quimioterapêuticos gerais considerados para uso em terapias de combinação incluem anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), bussulfano (Myleran®), injeção de bussulfano (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desóxi-5-fluorocitidina, carboplatina (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucila (Leukeran®), cisplatina (Platinol®),

cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytoxan® ou Neosar®), citarabina, arabinosídeo de citosina (Cytosar-U®), injeção de lipossoma de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), cloridrato de daunorrubicina (Cerubidine®), injeção de lipossoma de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), cloridrato de doxorrubicina (Adriamycin®, Rubex®), etoposídeo (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracila (Adrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, Gencitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiureia (Hydrea®), Idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecano (Camptosar®), L-asparaginase (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalana (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Ítrio 90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosano 20 com implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), teniposida (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), cloridrato de topotecano para injeção (Hycamptin®), vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) e vinorelbina (Navelbine®) e pemetrexed.

[00310] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método de tratar ou prevenir o câncer por administração a um sujeito necessitado de um conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção em combinação com um ou mais inibidores da tirosina quinase, incluindo, mas não limitado a, inibidores de BTK, inibidores de EGFR, inibidores de Her2, inibidores de Her3, inibidores de IGFR e inibidores de Met.

[00311] Por exemplo, inibidores de tirosina quinase incluem, mas não se limitam a, Ibrutinib (PCI-32765); cloridrato de Erlotinib (Tarceva®); Linifanib (N-[4-(3-amino-1H-indazol-4-il)fenil]-N'-(2-fluoro-5-metilfenil) ureia, também conhecido como ABT 869, disponível junto à Genentech); malato de Sunitinib (Sutent®); Bosutinib (4-[(2,4-dicloro-5-meto-

xifenil)amino]-6-metóxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrila, também conhecido como SKI-606 e descrito na Patente US Nº 6,780,996); Dasatinib (Sprycel®); Pazopanib (Votrient®); Sorafenib (Nexavar®); Zactima (ZD6474); e Imatinib ou mesilato de Imatinib (Gilvec® e Gleevec®).

[00312] Inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) incluem, mas não se limitam a, cloridrato de Erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®); N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[[(3"S")-tetra-hidro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4(dimetilamino)-2-butenamida, Tovok®); Vandetanib (Caprelsa®); Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-Amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil) piperidin-3-ol (BMS690514); dicloridrato de Canertinib (CI-1033); 6-[4-[(4-Etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]- 7H-Pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-amina (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (BIBW2992); Neratinib (HKI-272); ácido N-[4-[[1-[(3-Fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f] [1,2,4] triazin-6-il]-carbâmico, éster (3S)-3-morfolinilmetílico (BMS599626); N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metóxi-7-[[(3aα,5β,6aα)-octa-hidro-2-metil-ciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]- 4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613 -23-8); e 4-[4-[[(1R)-1-Feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol (PKI166, CAS 187724-61-4).

[00313] Anticorpos EGFR incluem, mas não se limitam a, Cetuximab (Erbitux®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); e ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

[00314] Inibidores do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico 2 (receptor Her2) (também conhecido como Neu, ErbB-2, CD340 ou p185) incluem, mas não se limitam a, Trastuzumab (Herceptin®); Pertuzumab (Omnitarg®); trastuzumab emtansina (Kadcyla®); Neratinib (HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-cloro-4-[(piridin-2-il)metoxi]fenil]amino]-3-ciano-

7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida e descritos na Publicação PCT Nº WO 05/028443); Lapatinib ou ditosilato de Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[[(3S)-tetra-hidro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); ácido N-[4-[[1-[(3-Fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbâmico, éster (3S)-3-morfolinilmetílico (BMS 599626, CAS 714971-09-2); dicloridrato de Canertinib (PD183805 ou CI-1033); e N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metóxi-7-[[(3aα,5β,6aα)-octa-hidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8).

[00315] Inibidores de Her3 incluem, mas não se limitam a, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 e MEHD-7945A.

[00316] Inibidores de MET incluem, mas não se limitam a, Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, anteriormente XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-hidróxi-2-metilpropil)-*N*-(5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)piridin-2-il)-5-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-carboxamida (AMG 458); Cryzotinib (Xalkori®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-Di-hidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il}metileno)-1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona (SU11271); (3Z)-N-(3-Clorofenil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il}metileno)-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11274); (3Z)-N-(3-Clorofenil)-3-{[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-il]metileno}-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11606); 6-[Difluoro[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin-3-il]metil]-quinolina (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(Quinolin-6-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazin-6-il]-1H-pirazol-1-il]etanol

(PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-Dioxan-2-ilmetil)-N-metil-N'-[3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-oxo-5H-benzo[4,5]ciclo-hepta[1,2-b]piridin-7-il]sulfamida (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-Metil-1*H*-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]piridazin-3-il]tio]-quinolina (SGX523, CAS 1022150-57-7); e (3*Z*)-5-[[(2,6-Diclorofenil)metil]sulfonil]-3-[[3,5-dimetil-4-[[(2*R*)-2-(1-pirrolidinilmetil)-1-pirrolidinil]carbonil]-1*H*-pirrol-2-il]metileno]-1,3-di-hidro-2*H*-indol-2-ona (PHA665752, CAS 477575-56-7).

[00317] Inibidores de IGF1R incluem, mas não se limitam a, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 e BI836845. Ver, por exemplo, Yee, JNCI, 104; 975 (2012) para análise.

[00318] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratar ou prevenir o câncer por administração a um sujeito necessitado de um conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção em combinação com um ou mais inibidores da via de sinalização a jusante de CCR7, incluindo, mas não se limitando a, inibidores de β-arrestina, inibidores de GRK, inibidores de MAPK, inibidores de PI3K, inibidores de JAK.

[00319] Por exemplo, inibidores de fosfoinositida 3-quinase (PI3K) incluem, mas não se limitam a, Idelalisib (Zydelig, GS-1101, Cal-101), 4-[2-(1H-Indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]tieno[3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (também conhecida como GDC 0941 e descrita nas Publicações PCT Nºs WO 09/036082 e WO 09/055730); 2-Metil-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-di-hidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil]propionitrila (também conhecida como BEZ 235 ou NVP-BEZ 235, e descrita na Publicação PCT Nº WO 06/122806); 4-(trifluoro-metil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)piridin-2-amina (também conhecida como BKM120 ou NVP-BKM120, e descrita na Publicação PCT Nº WO2007/084786); Tozasertib (VX680 ou MK-0457, CAS 639089-54-

6); (5Z)-5-[[4-(4-Piridinil)-6-quinolinil]metileno]-2,4-tiazolidinadiona (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(Acetiloxi)-1-[(di-2-propenilamino)metileno]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-octa-hidro-11-hidróxi-4-(metoximetil)-4a,6a-dimetil-ciclopenta[5,6]nafto[1,2-c]piran-2,7,10(1H)-triona (PX866, CAS 502632-66-8); e 8-Fenil-2-(morfolin-4-il)-cromen-4-ona (LY294002, CAS 154447-36-6).

[00320] Ainda em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratar ou prevenir o câncer por administração a um sujeito necessitado de um conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção em combinação com uma ou mais pro-apoptose, incluindo, mas não se limitando a, inibidores de IAP, inibidores de Bcl2, inibidores de MCl1, inibidores de Trail, inibidores de Chk.

[00321] Por exemplo, inibidores de IAP, incluem, mas não se limitam a, LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 e TL32711. Outros exemplos de inibidores de IAP incluem, mas não se limitam a, os divulgados em WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 e WO08/134679, todos os quais são aqui incorporados por referência.

[00322] Inibidores de BCL-2 incluem, mas não se limitam a, Venetoclax (também conhecido como GDC-0199, ABT-199, RG7601); 4-[4-[[2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclo-hexen-1-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-morfolinil)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-[(trifluorometil)sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida (também conhecida como ABT-263 e descrita na Publicação PCT Nº WO 09/155386); Tetrocarcin A; Antimicina; Gossipol ((-)BL-193); Obatoclax; Etil-2-amino-6-ciclopentil-4-(1-ciano-2-etóxi-2-oxoetil)-4Hcromona-3-carboxilato (HA14 – 1); Oblimersen (G3139, Genasense®); peptídeo Bak BH3; (-)-Gossipol ácido acético (AT-101); 4-[4-[(4'-cloro[1,1'-bifenil]-2-il)metil]-1-piperazinil]-**N**-[[4-[[(1**R**)-3-(dimetilamino)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-

3-nitrofenil]sulfonil]-benzamida (ABT-737, CAS 852808-04-9); e Navitoclax (ABT-263, CAS 923564-51-6).

[00323] Agonistas de receptor proapoptóticos (PARAs), incluindo DR4 (TRAILR1) e DR5 (TRAILR2), incluindo, mas não se limitando a, Dulanermin (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); Mapatumumab (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); Lexatumumab (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); Apomab (Apomab®); Conatumumab (AMG655, CAS 896731-82-1); e Tigatuzumab (CS1008, CAS 946415-34-5, comercializado pela Daiichi Sankyo).

[00324] Inibidores de quinase de ponto de verificação (CHK) incluem, mas não se limitam a, 7-Hidroxistaurosporina (UCN-01); 6-Bromo-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-(3*R*)-3-piperidinil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina (SCH900776, CAS 891494-63-6); ácido 5-(3-Fluorofenil)-3-ureidotiofeno-2-carboxílico N-[(S)-piperidin-3-il]amida (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[((3S)-1-Azabiciclo[2.2.2]oct-3-il)amino]-3-(1H-benzimidazol-2-il)-6-cloroquinolin-2(1H)-ona (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-aminodactinomicina (7-AAD), Isogranulatimida, debromohimenialdisina; N-[5-Bromo-4-metil-2-[(2S)-2-morfolinilmetoxi]-fenil]-N'-(5-metil-2-pirazinil)ureia (LY2603618, CAS 911222-45-2); Sulforafano (CAS 4478-93-7, isotiocianato de 4-Metilsulfinilbutilo); 9,10,11,12-Tetraidro-9,12-epóxi-1*H*-diindolo[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]pirrolo[3,4-*i*][1,6]benzodiazocina-1,3(2*H*)-diona (SB-218078, CAS 135897-06-2); e TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL), (SEQ ID NO: 629)), e CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr).

[00325] Em uma modalidade adicional, a presente invenção fornece um método de tratar ou prevenir o câncer por administração a um sujeito necessitado de um conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção em combinação com um ou mais imunomoduladores (por exemplo, um ou mais de: um ativador de uma molécula coestimulatória ou um inibidor de uma molécula de ponto de verificação imune).

[00326] Em certas modalidades, o imunomodulador é um ativador de uma molécula coestimulatória. Em uma modalidade, o agonista da molécula coestimulatória é escolhido de um agonista (p.ex., um anticorpo agonístico ou seu fragmento de ligação ao antígeno ou uma fusão solúvel) de ligante OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, STING ou CD83.

[00327] Em certas modalidades, o imunomodulador é um inibidor de uma molécula do ponto de verificação imunológico. Em uma modalidade, o imunomodulador é um inibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e/ou TGFR beta. Em uma modalidade, o inibidor de uma molécula do ponto de verificação imunológica inibe PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 ou CTLA4 ou qualquer sua combinação. O termo “inibição” ou “inibidor” inclui uma redução em um certo parâmetro, p.ex., uma atividade, de uma dada molécula, p.ex., um inibidor do ponto de verificação imunológico. Por exemplo, a inibição de uma atividade, p.ex., uma atividade de PD-1 ou PD-L1, de pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% ou mais está incluída por este termo. Assim, a inibição não necessita de ser 100%.

[00328] Inibição de uma molécula inibidora pode ser realizada a nível do DNA, RNA ou da proteína. Em certas modalidades, um ácido nucleico inibidor (p. ex., um dsRNA, shRNA ou siRNA), podem ser usados para inibir a expressão de uma molécula inibidora. Em outras modalidades, o inibidor de um sinal inibidor é um polipeptídeo, p.ex., um ligante solúvel (p. ex., PD-1-Ig ou CTLA-4 Ig), ou um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, que se liga à molécula inibidora; por exemplo, um anticorpo ou um seu fragmento (também aqui referido como "molécula de anticorpo"), que se liga a PD-1, PD-L1, PD-

L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e/ou TGFR beta ou uma combinação destes.

[00329] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo é um anticorpo completo ou seu fragmento (por exemplo, um fragmento Fab, $F(ab')_2$, Fv ou Fv de cadeia única (scFv)). Ainda em outras modalidades, a molécula de anticorpo tem uma região constante de cadeia pesada (Fc) escolhida de, por exemplo, regiões constantes de cadeia pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente, escolhidas, por exemplo, das regiões constantes de cadeia pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mais particularmente, a região constante de cadeia pesada de IgG1 ou IgG4 (por exemplo, IgG1 ou IgG4 humana). Em uma modalidade, a região constante de cadeia pesada é IgG1 humana ou IgG4 humana. Em uma modalidade, a região constante é alterada, p.ex., mutada, para modificar as propriedades da molécula de anticorpo (p.ex., para aumentar ou diminuir um ou mais de: ligação de receptor Fc, glicosilação de anticorpo, o número de resíduos de cisteína, função de células efetoras ou função do complemento).

[00330] Em certas modalidades, a molécula de anticorpo está na forma de uma molécula de anticorpo biespecífica ou multiespecífica. Em uma modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica tem uma primeira especificidade de ligação a PD-1 ou PD-L1, e uma segunda especificidade de ligação, por exemplo, uma segunda especificidade de ligação a TIM-3, LAG-3 ou PD-L2. Em uma modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica se liga a PD-1 ou PD-L1 e TIM-3. Em outra modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica se liga a PD-1 ou PD-L1 e LAG-3. Em outra modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica se liga a PD-1 e PD-L1. Ainda em outra modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica se liga a PD-1 e PD-L2. Em outra modalidade, a molécula de anticorpo biespecífica se liga a TIM-3 e LAG-3.

Qualquer combinação das referidas moléculas pode ser feita em uma molécula de anticorpo multiespecífica, p. ex., um anticorpo triespecífico que inclui uma primeira especificidade de ligação a PD-1 ou PD-1, e uma segunda e terceira especificidades de ligação a dois ou mais de: TIM-3, LAG-3 ou PD-L2.

[00331] Em certas modalidades, o imunomodulador é um inibidor de PD-1, por exemplo, PD-1 humano. Em outra modalidade, o imunomodulador é um inibidor de PD-L1, por exemplo, PD-L1 humano. Em uma modalidade, o inibidor de PD-1 ou PD-L1 é uma molécula de anticorpo para PD-1 ou PD-L1. O inibidor de PD-1 ou PD-L1 pode ser administrado isoladamente ou em combinação com outros imunomoduladores, p. ex., em combinação com um inibidor de LAG-3, TIM-3 ou CTLA4. Em uma modalidade exemplificativa, o inibidor de PD-1 ou PD-L1, por exemplo, a molécula de anticorpo anti-PD-1 ou PD-L1, é administrado em combinação com um inibidor de LAG-3, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-LAG-3. Em outra modalidade, o inibidor de PD-1 ou PD-L1, por exemplo, a molécula de anticorpo anti-PD-1 ou PD-L1, é administrado em combinação com um inibidor de TIM-3, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-TIM-3. Ainda em outras modalidades, o inibidor de PD-1 ou PD-L1, p. ex., a molécula de anticorpo anti-PD-1, é administrado em combinação com um inibidor de LAG-3, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-LAG-3 e um inibidor de TIM-3, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-TIM-3. Outras combinações de imunomoduladores com um inibidor de PD-1 (por exemplo, um ou mais de PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e/ou TGFR) estão também dentro do escopo da presente invenção. Qualquer uma das moléculas de anticorpo conhecidas na técnica ou divulgadas neste documento pode ser utilizada nas referidas combinações de inibidores de molécula de ponto de verificação.

[00332] Em uma modalidade, o inibidor de PD-1 é um anticorpo an-

ti-PD-1 escolhido de Nivolumab, Pembrolizumab ou Pidilizumab. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é Nivolumab. Nomes alternativos para Nivolumab incluem MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 ou BMS-936558. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é Nivolumab (número de registro CAS: 946414-94-4). Nivolumab é um anticorpo monoclonal IgG4 totalmente humano que bloqueia especificamente PD-1. Nivolumab (clone 5C4) e outros anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a PD1 são divulgados na Pat. US Nº 8,008,449 e Publicação PCT Nº WO2006/121168.

[00333] Em outras modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é Pembrolizumab. Pembrolizumab (nome comercial KEYTRUDA, anteriormente conhecida como Lambrolizumab, também conhecido como Merck 3745, MK-3475 ou SCH-900475) é um anticorpo monoclonal IgG4 humanizado que se liga a PD1. Pembrolizumab é divulgado, p. ex., em Hamid, O. *et al.* (2013), *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, Publicação PCT Nº WO2009/114335 e Patente US nº 8,354,509.

[00334] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é Pidilizumab. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) é um anticorpo monoclonal IgG1k humanizado que se liga a PD1. Pidilizumab e outros anticorpos monoclonais anti-PD-1 humanizados são divulgados na Publicação PCT Nº WO2009/101611. Outros anticorpos anti-PD1 são divulgados na Patente US Nº 8,609,089, Publicação US Nº 2010028330 e/ou Publicação US Nº 20120114649. Outros anticorpos anti-PD1 incluem AMP 514 (Amplimmune).

[00335] Em algumas modalidades, o inibidor de PD-1 é PDR001 ou qualquer outro anticorpo anti-PD-1 divulgado em WO2015/112900.

[00336] Em algumas modalidades, o inibidor de PD-1 é uma imunoadesina (por exemplo, uma imunoadesina compreendendo uma porção de ligação extracelular ou de PD-1 de PD-LI ou PD-L2 fundida com uma região constante (por exemplo, uma região de Fc de uma

sequência de imunoglobulina)). Em algumas modalidades, o inibidor de PD-1 é AMP-224.

[00337] Em algumas modalidades, o inibidor de PD-LI é anticorpo anti-PD-LI. Em algumas modalidades, o inibidor de anti-PD-LI é selecionado de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736 ou MDX-1105MSB-0010718C (também referido como A09-246-2) divulgado em, por exemplo, WO 2013/0179174, e tendo uma sequência aqui divulgada (ou uma sequência substancialmente idêntica ou similar a ela, por exemplo, uma sequência pelo menos 85%, 90%, 95% idêntica ou mais à sequência especificada).

[00338] Em uma modalidade, o inibidor de PD-L1 é MDX-1105. MDX-1105, também conhecido como BMS-936559, é um anticorpo anti-PD-LI descrito na publicação PCT N° WO2007/005874.

[00339] Em uma modalidade, o inibidor de PD-L1 é YW243.55.S70. O anticorpo YW243.55.S70 é um anti-PD-LI descrito na Publicação PCT N° WO 2010/077634 (sequências de região variável de cadeia pesada e leve mostradas nas SEQ ID Nºs 20 e 21, respectivamente).

[00340] Em uma modalidade, o inibidor de PD-L1 é MDPL3280A (Genentech / Roche). MDPL3280A é um anticorpo monoclonal IgG1 Fc humano otimizado que se liga a PD-L1. MDPL3280A e outros anticorpos monoclonais humanos para PD-L1 são revelados na Patente U.S Nº: 7.943.743 e Publicação U.S. Nº: 20120039906.

[00341] Em outras modalidades, o inibidor de PD-L2 é AMP-224. AMP-224 é um receptor solúvel de fusão Fc PD-L2 que bloqueia a interação entre PD1 e B7-H1 (B7-DCIg; Amplimmune; por exemplo, divulgado nas Publicações PCT Nº WO2010/027827 e WO2011/066342).

[00342] Em uma modalidade, o inibidor de LAG-3 é uma molécula de anticorpo anti-LAG-3. Em uma modalidade, o inibidor de LAG-3 é BMS-986016.

Composições Farmacêuticas

[00343] Para preparar composições farmacêuticas ou esterilizadas, incluindo imunoconjugados, os imunoconjugados da invenção são misturados com um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável. As composições podem adicionalmente conter um ou mais agentes terapêuticos que são adequados para tratar ou prevenir um CCR7 que expressa câncer (incluem, mas não se limitam a, leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), carcinoma gástrico, câncer do pulmão de células não pequenas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer da cabeça e do pescoço, carcinoma nasofaríngeo (NPC), câncer do esôfago, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer da tireoide, câncer da mama, câncer de células renais e câncer do colo do útero).

[00344] As formulações de agentes terapêuticos e diagnósticos podem ser preparadas por mistura com veículos, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis na forma de, por exemplo, pós liofilizados, pastas fluidas, soluções aquosas, loções ou suspensões (consultar, por exemplo, Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nova Iorque, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, e Wilkins, Nova Iorque, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner e Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., 2000).

[00345] Selecionar um regime de administração para um produto terapêutico depende de diversos fatores, incluindo a taxa de renovação de soro ou tecido da entidade, o nível de sintomas, a imunogenicidade da entidade e a acessibilidade das células-alvo na matriz biológica. Em determinadas modalidades, um regime de administração maximiza a quantidade de produto terapêutico entregue ao paciente consistente com um nível aceitável de efeitos colaterais. Consequentemente, a quantidade de produto biológico entregue depende, em parte, da entidade particular e da gravidade da afecção sendo tratada. A orientação para selecionar doses apropriadas de anticorpos, citocinas e moléculas pequenas está disponível (consultar, por exemplo, Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido, 1996; Kresina (ed.), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nova Iorque, N.Y., 1991; Bach (ed.), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nova Iorque, N.Y., 1993; Baert et al., New Engl. J. Med. 348:601 a 608, 2003; Milgrom et al., New Engl. J. Med. 341: 1.966 a 1.973, 1999; Slamon et al., New Engl. J. Med. 344:783 a 792, 2001; Beniaminovitz et al., New Engl. J. Med. 342:613 a 619, 2000; Ghosh et al., New Engl. J. Med. 348:24 a 32, 2003; Lipsky et al., New Engl. J. Med. 343:1.594 a 1.602, 2000).

[00346] A determinação da dose apropriada é feita pelo médico, por exemplo, com o uso de parâmetros ou fatores conhecidos ou suspeitos na técnica de afetar o tratamento ou prevenção ou previstos para afetar o tratamento ou prevenção. Geralmente, a dose começa com uma quantidade de algum modo menor do que a dose ideal e a mesma é aumentada por pequenos incrementos posteriormente até o efeito desejado ou ideal ser alcançado em relação a quaisquer efeitos colaterais negativos. As medidas diagnósticas importantes incluem aquelas de sintomas, por exemplo, da inflamação ou nível das citocinas in-

flamatórias produzidas.

[00347] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de forma a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para se alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente em particular, composição e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou seu éster, sal ou amida, a via de administração, o momento de administração, a taxa de excreção do composto particular sendo empregado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico prévio do paciente sendo tratado e fatores similares conhecidos nas técnicas médicas.

[00348] As composições que compreendem anticorpos ou seus fragmentos da invenção podem ser fornecidas por infusão contínua ou por doses em intervalos de, por exemplo, um dia, uma semana, ou 1 a 7 vezes por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez a cada cinco semanas, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada sete semanas ou uma vez a cada oito semanas. As doses podem ser fornecidas por via intravenosa, subcutânea, tópica, oral, nasal, retal, intramuscular, intracerebral ou por inalação. Um protocolo de dose específico envolve a dose ou frequência de dose máxima que evita efeitos colaterais indesejáveis significativos.

[00349] Para os imunoconjugados da invenção, a dosagem administrada a um paciente pode ser 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg do peso corporal do paciente. A dosagem pode estar entre 0,0001 mg/kg e 30 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 10 mg/kg, 0,0001

mg/kg e 5 mg/kg, 0,0001 e 2 mg/kg, 0,0001 e 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg ou 0,01 a 0,10 mg/kg do peso corporal do paciente. A dosagem dos anticorpos ou seus fragmentos da invenção pode ser calculada por meio do peso do paciente em quilogramas (kg) multiplicado pela dose a ser administrada em mg/kg.

[00350] As doses dos imunoconjugados da invenção podem ser repetidas, e as administrações podem ser separadas por menos do que 1 dia, pelo menos 1 dia, 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias, 2 meses, 75 dias, 3 meses, 4 meses, 5 meses ou pelo menos 6 meses. Em algumas modalidades, os imunoconjugados da invenção podem ser administrados duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas ou com menos frequência. Em uma determinada modalidade, as doses de imunoconjugados da invenção são repetidas a cada 2 semanas.

[00351] Uma quantidade eficaz para um paciente particular pode variar dependendo de fatores, tais como a afecção sendo tratada, a saúde geral do paciente, o método, via e dose de administração e a gravidade dos efeitos colaterais (consultar, por exemplo, Maynard *et al.*, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido, 2001).

[00352] A via de administração pode ser, por exemplo, por aplicação tópica ou cutânea, injeção ou infusão por administração subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intracerebrospinal, intralesional ou por sistemas de liberação prolongada ou um implante (consultar, por exemplo, Sidman *et al.*, Biopolymers 22:547 a 556, 1983; Langer *et al.*, J. Biomed. Ma-

ter. Res. 15:167 a 277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98 a 105, 1982; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 a 3692, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 a 4034, 1980; Patentes U.S. Nº 6,350,466 e 6,316,024). Nos casos em que for necessário, a composição pode também incluir um agente de solubilização ou um anestésico local, tal como lidocaína, para diminuir a dor no sítio da injeção ou ambos. Adicionalmente, a administração pulmonar pode também ser empregada, por exemplo, pelo uso de um inalador ou nebulizador e formulação com um agente de aerossolização. Consultar, por exemplo, as Patentes U.S. Nº 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 e 4,880,078; e Publicações PCT Nº WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 e WO 99/66903, sendo que cada uma das quais é incorporada ao presente documento a título de referência na sua totalidade.

[00353] Uma composição da presente invenção também pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração usando uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo especialista perito, a rota e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. As vias de administração selecionadas para os imunoconjugados da invenção incluem vias de administração endovenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, intradérmica, medula ou outras vias de administração parenteral, por exemplo, por injeção ou infusão. Administração parenteral pode representar modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intrasternal. Alternativamente, uma composição da invenção pode ser administrada através

de uma via não parenteral, tal como uma via de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por exemplo, por via intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica. Em uma modalidade, os imunoconjugados da invenção são administrados por infusão. Em outras modalidades, os imunoconjugados da invenção são administrados subcutaneamente.

[00354] Se os imunoconjugados da invenção forem administrados em um sistema de liberação controlada ou de liberação sustentada, pode ser usada uma bomba para alcançar liberação controlada ou sustentada (ver Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald *et al.*, Surgery 88:507, 1980; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:574, 1989). Podem ser usados materiais poliméricos para alcançar liberação controlada ou sustentada das terapias da invenção (ver, por exemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; ver também Levy *et al.*, Science 228:190, 1985; During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard *et al.*, J. Neurosurg. 7 1:105, 1989; Pat. U.S. Nº 5,679,377; Pat. U.S. Nº 5,916,597; Pat. U.S. Nº 5,912,015; Pat. U.S. Nº 5,989,463; Pat. U.S. Nº 5,128,326; Publicação PCT Nº WO 99/15154; e Publicação PCT Nº WO 99/20253). Exemplos de polímeros utilizados em formulações de liberação sustentada incluem, mas não se limitam a, poli(2-hidroxi metacrilato de etila), poli(metacrilato de metila), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinila), poli(ácido metacrílico), poliglicolídeos (PLG), polianidridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(álcool vinílico), poliacrilamida, poli(etilenoglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolídeos) (PLGA) e poliortoésteres. Em uma modalidade, o polímero usado em uma formulação de liberação sustentada é inerte, isento de impurezas lixiviáveis, estável no armaze-

namento, estéril e biodegradável. Um sistema de liberação controlada ou sustentada pode ser colocado na proximidade do alvo profilático ou terapêutico, exigindo, portanto, apenas uma porção da dose sistêmica (ver, por exemplo, Goodson, em Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas 115 a 138, 1984).

[00355] Os sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão de Langer, Science 249:1527-1533, 1990. Qualquer técnica conhecida dos entendidos na técnica pode ser usada para produzir formulações de liberação sustentada compreendendo um ou mais imunoconjugados da invenção. Consultar, por exemplo, as Patentes U.S. Nº 4,526,938, Publicação PCT WO 91/05548, Publicação PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song *et al.*, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995; Cleek *et al.*, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; e Lam *et al.*, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997, cada uma das quais é incorporada aqui por referência na sua totalidade.

[00356] Se os imunoconjugados da invenção forem administrados topicamente, podem ser formulados sob a forma de uma pomada, creme, penso transdérmico, loção, gel, spray, aerossol, solução, emulsão ou outra forma conhecida dos peritos na técnica. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosagem tópica não pulverizáveis, são tipicamente utilizadas formas viscosas a semissólidas ou sólidas compreendendo um veículo ou um ou mais excipientes compatíveis com a aplicação tópica e possuindo uma viscosidade dinâmica, em alguns casos, maior do que a da água. Formulações adequadas incluem, sem limitação, soluções, suspensões, emulsões, cremes, pomadas, pós, linimentos, unguentos, e afins, que são, se desejado, esterilizados ou misturados

com agentes auxiliares (por exemplo, conservantes, estabilizantes, agentes umectantes, tampões ou sais) para influenciar várias propriedades, tais como, por exemplo, pressão osmótica. Outras formas de dosagem tópica adequadas incluem preparações aerossol pulverizáveis, onde o ingrediente ativo, em alguns casos, em combinação com um veículo inerte sólido ou líquido, é embalado em uma mistura com um volátil pressurizado (por exemplo, um propulsor gasoso, como o freon) ou em uma garrafa comprimível. Hidratantes ou umectantes podem também ser adicionados a composições farmacêuticas e formas de dosagem, se desejado. Exemplos de tais ingredientes adicionais são bem conhecidos na técnica.

[00357] Se as composições compreendendo os imunoconjugados forem administradas por via nasal, podem ser formuladas em forma de aerossol, spray, pulverização ou sob a forma de gotas. Em particular, os agentes profiláticos ou terapêuticos para uso de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente administrados na forma de uma apresentação de pulverização de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou um nebulizador, com o uso de um propulsor adequado (por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado). No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para administrar uma quantidade calibrada. Cápsulas e cartuchos (compostos de, por exemplo, gelatina) para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido.

[00358] Os métodos para a coadministração ou tratamento com um segundo agente terapêutico, por exemplo, uma citocina, esteroide, agente quimioterápico, antibiótico ou radiação são conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman

and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edição, McGraw-Hill, Nova Iorque, N.Y.; Poole e Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadélfia, Pa.; Chabner e Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadélfia., Pa.). Uma quantidade eficaz do produto terapêutico pode diminuir os sintomas em pelo menos 10%; em pelo menos 20%; pelo menos cerca de 30%; pelo menos 40% ou pelo menos 50%.

[00359] Terapias adicionais (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) que podem ser administradas em combinação com os imunoconjugados da invenção, podem ser administradas com menos do que 5 minutos de diferença, menos do que 30 minutos de diferença, 1 hora de diferença, cerca de 1 hora de diferença, cerca de 1 a cerca de 2 horas de diferença, cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de diferença, cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de diferença, cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de diferença, cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de diferença, cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de diferença, cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de diferença, cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de diferença, cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de diferença, cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de diferença, cerca de 11 horas a cerca de 12 horas de diferença, cerca de 12 horas a 18 horas de diferença, 18 horas a 24 horas de diferença, 24 horas a 36 horas de diferença, 36 horas a 48 horas de diferença, 48 horas a 52 horas de diferença, 52 horas a 60 horas de diferença, 60 horas a 72 horas de diferença, 72 horas a 84 horas de diferença, 84 horas a 96 horas de diferença ou 96 horas a 120 horas de diferença dos imunoconjugados da invenção. As duas ou mais terapias podem ser administradas dentro de uma mesma visita do paciente.

[00360] Em certas modalidades, os imunoconjugados da invenção podem ser formulados para garantir uma correta distribuição *in vivo*.

Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção atravessam a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomos. Para métodos de fabrico de lipossomos, ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nº 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomos podem incluir uma ou mais porções que são seletivamente transportadas para células ou órgãos específicos, de modo a melhorar a distribuição orientada de fármaco (ver, por exemplo, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Exemplos de porções dirigidas a alvo incluem ácido fólico ou biotina (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5,416,016 de Low *et al.*); manosidas (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (Bloeman *et al.*, (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais *et al.*, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína tensioativa A (Briscoe *et al.*, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); ver também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

[00361] A invenção fornece protocolos para a administração da composição farmacêutica que compreende os imunoconjugados da invenção sozinhos ou em combinação com outras terapias a um sujeito que precisa das mesmas. As terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da presente invenção podem ser administradas concomitante ou sequencialmente a um sujeito. A terapia (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da presente invenção podem também ser administradas ciclicamente. A terapia de ciclagem envolve a administração de uma primeira terapia (por exemplo, um primeiro agente profilático ou terapêutico) por um período de tempo, seguida da administração de uma segunda terapia (por exemplo, um segundo agente pro-

filático ou terapêutico) por um período de tempo e a repetição dessa administração sequencial, isto é, o ciclo, a fim de reduzir o desenvolvimento de resistência a uma das terapias (por exemplo, agentes) para evitar ou reduzir os efeitos colaterais de uma das terapias (por exemplo, agentes) e/ou melhorar a eficácia das terapias.

[00362] As terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da presente invenção podem ser administradas concomitantemente a um sujeito.

[00363] O termo "concomitantemente" não se limita à administração de terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) exatamente ao mesmo tempo, mas significa que uma composição farmacêutica que compreende anticorpos ou fragmentos dos mesmos da invenção é administrada a um sujeito em uma sequência e dentro de um intervalo de tempo de modo que os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção possam atuar em conjunto com a outra terapia (ou terapias) para fornecer um benefício aumentado em relação a se os mesmos fossem administrados de outro modo. Por exemplo, cada terapia pode ser administrada a um sujeito ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem em diferentes pontos no tempo; no entanto, se não for administrada ao mesmo tempo, deve ser administrada em tempo suficientemente próximo de modo a fornecer o efeito terapêutico ou profilático desejado. Cada terapia pode ser administrada a um sujeito separadamente, em qualquer forma adequada e por qualquer via adequada. Em várias modalidades, as terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) são administradas a um indivíduo com menos do que 5 minutos de diferença, menos do que 15 minutos de diferença, menos do que 30 minutos de diferença, menos do que 1 hora de diferença, cerca de 1 hora de diferença, cerca de 1 hora a cerca de 2 horas de diferença, cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de diferença, cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de diferença,

cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de diferença, cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de diferença, cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de diferença, cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de diferença, cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de diferença, cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de diferença, cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de diferença, cerca de 11 horas a cerca de 12 horas de diferença, 24 horas de diferença, 48 horas de diferença, 72 horas de diferença ou 1 semana de diferença. Em outras modalidades, duas ou mais terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) são administradas dentro da mesma consulta do paciente.

[00364] Os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados a um sujeito na mesma composição farmacêutica. Alternativamente, os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados concomitantemente a um sujeito em composições farmacêuticas separadas. Os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser administrados a um sujeito por vias de administração iguais ou diferentes. Os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados a um sujeito na mesma composição farmacêutica. Alternativamente, os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados concomitantemente a um sujeito em composições farmacêuticas separadas. Os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser administrados a um sujeito por vias de administração iguais ou diferentes.

Exemplos

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Anti-CCR7

Geração de construtos de expressão para CCR7 de humano, rato, camundongo e macaco cinomolgo

[00365] Genes de CCR7 humano, cino e camundongo de comprimento total foram sintetizados com base em sequências de aminoáci-

dos dos bancos de dados GenBank ou Uniprot (SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101). O modelo de cDNA de CCR7 de rato teve o gene sintetizado com base em informações da sequência de aminoácidos gerada utilizando o mRNA isolado de diferentes tecidos de rato (SEQ ID NO 103). Todos os fragmentos de DNA sintetizados foram clonados em vetores de expressão adequada.

Tabela 2: Informações de sequência de nucleotídeos e de aminoácidos para CCR7

CCR7 de ser humano	
SEQ ID NO: 97	mdlgkpmksvlvvallvifqvclcqdevtddyigdnttvdytlfeslcskkdvrnfkawflpimysiicfv gllgnglvvltyiyfkrlktmtdtyllnlavadilfltlpfwaysaakswvfgvhfcklifaiykmsffsgmllll cisidryvaivqavsahrhrarvllisklscvgiwilatvlsipellysdlqrssseqamrcslitehveafiti qvaqmvigflvpllamsfcylviirtllqarnfernkaikviiavvvvfivfqlpyngvvlaqtvanfnitsst celskqlniaydvtyslacvrccvnpflyafigvkfrndlfklfkdlgclsqeqlrqwsscrhirrssmsve aettttfsp
SEQ ID NO: 98	ATGGACCTGGGGAAACCAATGAAAAGCGTGCTGGTGGTGGCTCTC CTTGTCATTTTCCAGGTATGCCTGTGTCAAGATGAGGTCACGGACG ATTACATCGGAGACAACACCACAGTGGACTACACTTTGTTCGAGTC TTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGGAACTTTAAAGCCTGGTTCCTC CCTATCATGTACTCCATCATTTGTTTCGTGGGCCTACTGGGCAATG GGCTGGTCGTGTTGACCTATATCTATTTCAAGAGGCTCAAGACCAT GACCGATACCTACCTGCTCAACCTGGCGGTGGCAGACATCCTCTTC CTCCTGACCCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGCGGCCAAGTCCTGG GTCTTCGGTGTCCACTTTTGCAAGCTCATCTTTGCCATCTACAAGAT GAGCTTCTTCAGTGGCATGCTCCTACTTCTTTGCATCAGCATTGACC GCTACGTGGCCATCGTCCAGGCTGTCTCAGCTCACCGCCACCGTG CCCGCGTCCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTGTGGGCATCTGGAT ACTAGCCACAGTGCTCTCCATCCCAGAGCTCCTGTACAGTGACCTC CAGAGGAGCAGCAGTGAGCAAGCGATGCGATGCTCTCTCATCACA GAGCATGTGGAGGCCTTTATCACCATCCAGGTGGCCCAGATGGTG ATCGGCTTTCTGGTCCCCCTGCTGGCCATGAGCTTCTGTTACCTTG TCATCATCCGCACCCTGCTCCAGGCACGCAACTTTGAGCGCAACAA GGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCGTGGTCTTCATAGTCTTC CAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCCCAGACGGTGGCCAAC TTCAACATCACCAGTAGCACCTGTGAGCTCAGTAAGCAACTCAACA TCGCCTACGACGTCACCTACAGCCTGGCCTGCGTCCGCTGCTGCG

	TCAACCCTTTCTTGTACGCCTTCATCGGCGTCAAGTTCCGCAACGA TCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACCTGGGCTGCCTCAGCCAGGAGCA GCTCCGGCAGTGGTCTTCCTGTCGGCACATCCGGCGCTCCTCCAT GAGTGTGGAGGCCGAGACCACCACCACCTTCTCCCCA
CCR7 de cino	
SEQ ID NO: 99	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLCQDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESLCS KKDVRNFKAWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVVLTYIYFKRLKTMTDTYLLN LAVADILFLLTLPFWAYSAAKSWVFGVHFCKLIFAIYKMSFFSGMLLLLC ISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLSCVGIWILATVLSIPELLYSGLQ RSSSEQAMRCSLITEHVEAFITIQVAQMVIGFLVPLLAMSFCYLVIIRTLL QARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVANFNITSSTCELSK QLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKFRNDLFKLFKDLGCLSQEQ LRQWSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP
SEQ ID NO: 100	ATGGACCTGGGGAAACCAATGAAAAGCGTGCTGGTGGTGGCTCTC CTTGTCATTTTCCAGGTATGCCTGTGTCAAGATGAGGTCACGGACG ATTACATCGGAGACAACACCACAGTGGACTACACTTTGTTCGAGTC TTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGGAACTTTAAAGCCTGGTTCCTC CCTATCATGTACTCCATCATTTGTTTCGTGGGCCTACTGGGCAATG GGCTGGTCGTGTTGACCTATATCTATTTCAAGAGGCTCAAGACCAT GACCGATACCTACCTGCTCAACCTGGCGGTGGCAGACATCCTCTTC CTCCTGACCCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGCGGCCAAGTCCTGG GTCTTCGGTGTCCACTTTTGCAAGCTCATCTTTGCCATCTACAAGAT GAGCTTCTTCAGTGGCATGCTCCTACTTCTTTGCATCAGCATTGACC GCTACGTGGCCATCGTCCAGGCTGTCTCAGCTCACCGCCACCGTG CCCGCGTCCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTGTGGGCATCTGGAT ACTAGCCACAGTGCTCTCCATCCCAGAGCTCCTGTACAGTGGCCTC CAGAGGAGCAGCAGTGAGCAAGCGATGCGATGCTCTCTCATCACA GAGCATGTGGAGGCCTTTATCACCATCCAGGTGGCCCAGATGGTG ATCGGCTTTCTGGTCCCCCTGCTGGCCATGAGCTTCTGTTACCTTG TCATCATCCGCACCCTGCTCCAGGCACGCAACTTTGAGCGCAACAA GGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCGTGGTCTTCATAGTCTTC CAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCCCAGACGGTGGCCAAC TTCAACATCACCAGTAGCACCTGTGAGCTCAGTAAGCAACTCAACA TCGCCTACGACGTCACCTACAGCCTGGCCTGCGTCCGCTGCTGCG TCAACCCTTTCTTGTACGCCTTCATCGGCGTCAAGTTCCGCAACGA TCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACCTGGGCTGCCTCAGCCAGGAGCA GCTCCGGCAGTGGTCTTCCTGTCGGCACATCCGGCGCTCCTCCAT GAGTGTGGAGGCCGAGACCACCACCACCTTCTCCCCA
CCR7 de ca-	

mundongo	
SEQ ID NO: 101	MDPGKPRKNVLVVALLVIFQVCFCQDEVTDDYIGENTTVDYTLYESVC FKKDVRNFKAWFLPLMYSVICFVGLLGNGLVILTYIYFKRLKTMTDTYLL NLAVADILFLLILPFWAYSEAKSWIFGVYLCKGIFGIYKLSFFSGMLLLLCI SIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLSCVGIWMLALFLSIPELLYSGLQ KNSGEDTLRCSLVSAQVEALITIQVAQMVFGFLVPMLAMSFCYLIIIRTL LQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVANFNITNSSCET SKQLNIAYDVTYSLASVRCCVNPFLYAFIGVKFRSDLFKLFKDLGCLSQ ERLRHWSSCRHVRNASVSMEAETTTTFSP
SEQ ID NO: 102	ATGGACCCAGGGAAACCCAGGAAAAACGTGCTGGTGGTGGCTCTC CTTGTCATTTTCCAGGTGTGCTTCTGCCAAGATGAGGTCACCGATG ACTACATCGGCGAGAATACCACGGTGGACTACACCCTGTACGAGTC GGTGTGCTTCAAGAAGGATGTGCGGAACTTTAAGGCCTGGTTCCTG CCTCTCATGTATTCTGTCATCTGCTTCGTGGGCCTGCTCGGCAACG GGCTGGTGATACTGACGTACATCTATTTCAAGAGGCTCAAGACCAT GACGGATACCTACCTGCTCAACCTGGCCGTGGCAGACATCCTTTTC CTCCTGATTCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGAAGCCAAGTCCTGGA TCTTTGGCGTCTACCTGTGTAAGGGCATCTTTGGCATCTATAAGTTA AGCTTCTTCAGCGGGATGCTGCTGCTCCTATGCATCAGCATTGACC GCTACGTAGCCATCGTCCAGGCCGTGTCGGCTCATCGCCACCGCG CCCGCGTGCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTGTGGGCATCTGGAT GCTGGCCCTCTTCCTCTCCATCCCGGAGCTGCTCTACAGCGGCCT CCAGAAGAACAGCGGCGAGGACACGCTGAGATGCTCACTGGTCAG TGCCCAAGTGGAGGCCTTGATCACCATCCAAGTGGCCCAGATGGT TTTTGGGTTCCTAGTGCCTATGCTGGCTATGAGTTTCTGCTACCTCA TTATCATCCGTACCTTGCTCCAGGCACGCAACTTTGAGCGGAACAA GGCCATCAAGGTGATCATTGCCGTGGTGGTAGTCTTCATAGTCTTC CAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCTCAGACGGTGGCCAAC TTCAACATCACCAATAGCAGCTGCGAAACCAGCAAGCAGCTCAACA TTGCCTATGACGTCACCTACAGCCTGGCCTCCGTCCGCTGCTGCGT CAACCCTTTCTTGTATGCCTTCATCGGCGTCAAGTTCCGCAGCGAC CTCTTCAAGCTCTTCAAGGACTTGGGCTGTCTCAGCCAGGAACGGC TCCGGCACTGGTCTTCCTGCCGGCATGTACGGAACGCGTCGGTGA GCATGGAGGCGGAGACCACCACAACCTTCTCCCCG
CCR7 de rato	
SEQ ID NO: 103	MDLGKPTKNVLVVALLVIFQVCFCQDEVTDDYIGENTTVDYTLYESVCF KKDVRNFKAWFLPLMYSVICFVGLLGNGLVVLTYIYFKRLKTMTDTYLL NLAVADILFLMILPFWAYSEAKSWIFGAYLCKSIFGIYKLSFFSGMLLLLC ISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLSCIGIWTLAFFLSIPELLYSGLQK

	NSGEDTWRCSLVSAQVEALIAIQVAQMVVGFVLPMLAMSFCYLVIIRTL LQARNFERNKAIKVIIAVVVVFVVFQLPYNGVVLAQTVANFNITNSSCEA SKQLNIAYDVTYSLASVRCCVNPFLYAFIGVKFRSDLFKLFKDLGCLSQ ERLRQWSSCRHVRHTSVSMEAETTTTFSP
SEQ ID NO: 104	ATGGACCTGGGGAAGCCCACGAAAAACGTGCTGGTGGTGGCTCTC CTGGTCATTTTCCAGGTGTGCTTCTGCCAAGATGAGGTCACAGACG ACTACATCGGCGAGAACACCACCGTGGACTACACCCTGTATGAGTC GGTGTGCTTCAAGAAGGATGTGCGGAACTTTAAGGCCTGGTTCCTC CCTCTCATGTACTCAGTCATTTGCTTCGTGGGCCTGCTAGGCAATG GGCTGGTGGTGCTGACATACATCTATTTCAAGAGACTGAAGACCAT GACGGATACCTACCTGCTCAACCTGGCCGTGGCAGACATCCTCTTC CTCATGATCCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGAAGCCAAGTCCTGGA TCTTTGGTGCCTACCTGTGTAAGAGCATCTTTGGCATCTACAAGTTA AGCTTCTTCAGCGGGATGTTGCTGCTCCTGTGTATCAGCATTGACC GCTATGTGGCCATCGTCCAGGCCGTGTCAGCCCACCGGCACCGCG CCCGCGTGCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTATAGGCATCTGGAC GCTGGCCTTTTTCCTTTCTATCCCTGAGCTGCTCTACAGCGGCCTC CAGAAGAACAGCGGCGAGGACACGTGGAGATGCTCCCTGGTCAGT GCCCAAGTGGAGGCCTTGATCGCCATCCAAGTGGCCCAGATGGTT GTTGGGTTTGTACTGCCTATGCTGGCTATGAGTTTCTGCTACCTGG TTATCATCCGCACTCTGCTCCAGGCGCGAAACTTCGAGCGGAACAA GGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCGTAGTGTTCGTCGTCTTC CAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCCCAGACCGTGGCCAAT TTCAACATCACCAATAGCAGCTGCGAAGCCAGCAAGCAGCTCAACA TTGCCTATGACGTCACCTACAGCCTGGCCTCCGTCCGCTGCTGTGT CAACCCTTTCTTGTATGCCTTCATCGGCGTCAAGTTCCGCAGCGAC CTCTTCAAGCTCTTCAAGGACTTGGGCTGCCTCAGCCAGGAACGG CTCCGGCAGTGGTCTTCCTGCCGCCATGTACGGCACACGTCCGTG AGCATGGAGGCGGAGACTACCACCACCTTCTCCCCG

Geração de linhagens celulares expressando estavelmente CCR7

[00366] Foram geradas linhagens celulares expressando CCR7 estável utilizando transdução retroviral. Células 293T foram cotransfectadas com um vetor de expressão retroviral CCR7 e um vetor de encapsulamento pCL-Eco ou pCL-10A1 (Novus, USA, cat#NBP2-29540 ou NBP2-2952) usando reagente de transfecção Fugene 6 (Promega, USA, cat# E2692), seguindo as recomendações do fabricante. As células foram incubadas em uma incubadora de CO_2 umidificada a 37°C e

o sobrenadante viral foi coletado 48 horas pós-transfecção. Células NIH/3T3 e 300.19 foram cultivadas até monocamada quase confluente. Meio de crescimento foi removido das células e sobrenadante viral foi adicionado na presença de 8 ug de polibreno/ml (concentração final) (EMD Millipore, cat#TR-1003-G). Após incubação por 3 a 6 horas a 37°C, foi adicionado meio fresco. As células foram então cultivadas sob condições de seleção adequadas para produzir linhagens celulares expressando CCR7 estável.

Geração, expressão e purificação de partículas tipo vírus (VLP)

[00367] Células HEK293T ou NIH/3T3 foram mantidas em DMEM com FBS a 10%. Para fazer VLP, as células foram trocadas em DMEM com FBS a 4% e, em seguida, cotransfectadas com um plasmídeo de expressão de CCR7 e um plasmídeo de expressão Gag retroviral a uma razão de µg de 3:2. Quarenta e oito horas pós-transfecção, o sobrenadante celular foi coletado e clarificado por centrifugação a 2500 x *g* por 5 min em uma centrífuga de bancada e mantido em gelo. As VLP foram purificadas por ultracentrifugação a 100.000 x *g* através de uma almofada de sacarose a 20% em tubos de centrifugação Beckman Ultra-Clear de 38 ml (catálogo # 344058) em um rotor Beckman Coulter SW 32 Ti em uma ultracentrífuga Sorvall RC 6+. Os péletes resultantes foram novamente suspensos em 300 µl de PBS esterilizado frio e quantificados utilizando um Ensaio BCA (Pierce catálogo # 23225).

Geração derivada por estrutura de moldes de imunógeno CCR7

[00368] Membros da família de receptor acoplados a proteína G são proteínas de membrana que contêm sete hélices transmembrana (TM1... TM7), cada uma conectada por sequências de ligação de comprimento variável. O terminal amino da proteína está do lado ecto da superfície celular, o que indica que 4 regiões da proteína estão potencialmente expostas na superfície da célula, o terminal amino (N-term) e 3 regiões de alça extracelulares (EC1, EC2 e EC3). Estas regi-

ões estão assim disponíveis como antígenos para anticorpos.

[00369] Foi previsto que uma combinação de uma ou mais destas 4 entradas poderia ser inserida em um molde de proteína solúvel para aproximar estruturalmente a região exposta extracelularmente de CCR7.

[00370] Para determinar as regiões extracelulares ideais de CCR7, foi construído um modelo usando a estrutura cristalina do homólogo próximo CXCR4 (Wu *et al.*, "Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists." (2010) Science 330: 1066-1071) usando uma combinação de estrutura CXCR4 com entradas do banco de Dados de Proteína (3ODU, 3OE0, 3OE6, 3OE8, 3OE9) e software de modelagem. Aminoácidos que eram intersticiais para as hélices transmembrana de ligação foram inferidos a partir do modelo a ser exposto na superfície da proteína. Estas regiões são identificadas na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Informações de Sequência de Nucleotídeos e de Aminoácidos para Molde de Imunógeno de CCR7

SEQ ID NO:	**Descrição**		**Comentários**
105	CCR7 (NP_001829.1| receptor de quimiocina C-C tipo 7)	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLC**QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESLC SKKDVR**NFKAWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVVLTYIYFKRLKTMTDTYL LNLAVADILFLLTLPFWAYSAA**KSWVFGVH**FCKLIFAIYKMSFFSGMLL LLCISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLSCVGIWILATVLSIPELL**YS DLQRSSSEQAMRCSLIT**EHVEAFITIQVAQMVIGFLVPLLAMSFCYLVII RTLLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVAN**FNITSST** CELSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKFRNDLFKLFKDLGC LSQEQLRQWSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP	CCR7, precursor. As regiões extracelulares são destacadas em negrito. As regiões de inserto ou seus derivados estão em negrito e sublinhadas.
106	N-termo	**QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVR**	Sequência extracelular de terminal N CCR7
107	EC1	**KSWVFGVH**	Alça extracelular CCR7 1
108	EC2	**YSDLQRSSSEQAMRCSLIT**	Alça extracelular CCR7 2
109	EC3	**FNITSST**	Alça extracelular CCR7 3
110	EC2_C24S	**YSDLQRSSSEQAMRSSLIT**	
111	H_MGFTX1	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMLWVRQAPEKGLE WIAYISSGSSTIYYADRVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYY CSTGTFAYWGQGTPVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGC	Cadeia pesada de molde Fab de camundongo

SEQ ID NO:	Descrição		Comentários
		LVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC	
112	L_MGFTX1	DVVMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLIYNNGNTYLHWYRQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQ STHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Cadeia leve de molde Fab de camundongo
113	H_FabCCR7M1	**QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVR**EVQLVESGGGLVKPGGS LKLSCAASGFTFSDYGMLWVRQAPEKGLEWIAYISSGSSTIYYADRVK GRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCSTGT**YSDLQRSSSEQA MRSSLIT**FAYWGQGTPVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC	Cadeia pesada de Fab com N-termo e EC2 inseridos. Sequências inseridas sublinhadas e em negrito
114	H_FabCCR7M1	CAAGATGAGGTCACGGACGATTACATCGGAGACAACACCACAGTG GACTACACTTTGTTCGAGTCTTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGGg aggtgcagctggtggagtctggtggtggtctggtcaagcctggaggttccctgaaactgagttgtgc cgcatctgggtttacattctctgactacggaatgctgtgggtgaggcaggcaccagagaagggcct ggaatggatcgcttatatttccagcggatctagtactatctactatgcagacagggtcaagggccgg ttcaccattagcagagataacgccaaaaataccctgtttctgcagatgacatcactgaggtccgag	Sequência de DNA de cadeia pesada HFab-CCR7M1. Sequência inserida em maiúsculas

SEQ ID NO:	Descrição		Comentários
		gataccgctatgtattattgctccacagggactTACAGTGACCTCCAGAGGAGCAG CAGTGAGCAAGCGATGCGATCCTCTCTCATCACAtttgcttactggggacag gggacacccgtgaccgtcagctcagccaagaccacccccccccagcgtgtaccctctggcccctg gctctgccgcccagaccaacagcatggtgaccctgggctgcctggtgaagggctacttccccgag cccgtgaccgtgacctggaacagcggcagcctgagcagcggcgtgcacaccttccccgccgtg ctgcagagcgacctgtacaccctgagcagctctgtgaccgtgcccagcagcacctggcccagcg agaccgtgacatgcaacgtggcccaccccgccagctccaccaaggtggacaagaaaatcgtgc cccgggactgc	
115	L_MGFTX1	atgtcgtgatgactcagaatccactgtccctgcctgtgtccctgggcgatcaggcttccattagctgtc gttcctctcagtccctgatctacaacaatggtaacacctacctgcactggtatagacagaagcccg gccagtcccctaagctgctgatctacaaagtgagtaataggttctcaggagtcccagaccggttttc cggcagcggatctgggaccgatttcacactgaaaatctctagggtggaggccgaagacctgggc gtctacttttgtagtcagagcactcacgtccccttcaccttcggcagcggaacaaaactggaaatca agcgcgctgatgccgcccctaccgtgagcatcttcccccccagcagcgagcagctgaccagcgg cggagccagcgtggtgtgcttcctgaacaacttctaccccaaggacatcaacgtgaagtggaaga tcgacggcagcgagcggcagaacggcgtgctgaacagctggaccgaccaggacagcaagga ctccacctacagcatgagcagcaccctgaccctgaccaaggacgagtacgagcggcacaaca gctacacctgcgaggccacccacaagaccagcaccagccccatcgtgaagagcttcaaccgg aacgagtgc	Sequência de DNA de L_MGFTX1

[00371] O pequeno tamanho das alças, EC1 e EC3 e a separação espacial de EC3 das outras três regiões priorizaram o uso de N-term e alça EC2 como epitopos candidatos.

[00372] Modelagem da fusão da sequência N-term na estrutura cristalina de um Fab de camundongo com a sequência EC2 inserida em diversas regiões de alça da FAB, tal como em *Framework* 1, CDR-H3 ou CDR3-H1, mostrou que se um grau de flexibilidade for assumido nas duas sequências, então estas poderiam ser aproximações razoáveis à estrutura destas regiões em CCR7.

Geração de molde de imunógeno para imunização de camundongo

[00373] Construtos enxertados para imunização de camundongo foram gerados pela fusão da sequência de terminal N da Tabela 3 para o terminal N da cadeia pesada de um molde de Fab de camundongo (designado MGFTX 1) e enxertando uma versão modificada da sequência EC2 com o resíduo de cisteína na posição 24 mutado para uma serina (Tabela 3 e sequências sublinhadas + em negrito de SEQ ID NO: 113), em CDR3 do molde MGFTX1 e, em seguida, ambas as cadeias de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve foram produzidas para gerar construtos de proteína final. Os construtos, designados FabCCR7M1, continham assim um *framework* de camundongo que deve ser imunotolerante combinado com a sequência humana para a qual a resposta imunológica do camundongo foi dirigida.

[00374] A sequência de N-term foi diretamente fundida com a cadeia pesada do molde MGFTX1. Os pontos de inserção para EC2 foram selecionados para ser o ponto médio da alça CDR com base em dados de modelo estrutural ou de homologia disponíveis. As proteínas enxertadas Fab foram produzidas usando metodologia de biologia molecular padrão, utilizando DNA recombinante codificando as sequências relevantes.

[00375] Por exemplo, uma região variável de cada anticorpo con-

tendo EC2 foi inserida em CDR3 de cadeia pesada e sintetizada. A região variável de codificação do DNA foi amplificada por PCR e o fragmento resultante foi subclonado em um vetor contendo a região constante de cadeia leve ou a região Fc e a região constante de cadeia pesada. Desta forma, as proteínas FabCCR7M1 foram feitas correspondendo à fusão de N-term e inserção de EC2 em H3. Os construtos resultantes são mostrados na Tabela 3. As transfecções da combinação adequada de vetores de cadeia leve e pesada resultam na expressão de um Fab recombinante contendo um N-term e uma molécula EC2.

[00376] A seleção a partir da qual CDR é escolhida para enxerto é determinada com base nos parâmetros de exposição da alça e proximidade com o terminal N. Neste momento, o software de modelagem é apenas parcialmente útil em prever que CDR e que localização dentro do CDR fornecerão os parâmetros desejados, devido à flexibilidade das alças após fusão e enxerto. A estrutura do molde MGFTX1 em combinação com o EC2_C24S (Tabela 3, SEQ ID NO: 110) mostrou a sequência a ser exposta e flexível, como julgado pela falta de densidade de elétrons para a maioria da sequência.

[00377] Em suma, o ponto de inserção na CDR foi escolhido em uma base estrutural, com a hipótese de que a enxertia na CDR iria fornecer algum nível de semelhança estrutural com o antígeno nativo.

Geração de hibridoma

[00378] Os camundongos transgênicos Bcl-2 (estirpe C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 WEHI) foram imunizados com antígeno utilizando um procedimento que exige Imunização Repetitiva em Vários Locais (RIMMS) (McIntyre GD. Hybridoma 1997). Resumidamente, os camundongos foram injetados com 1 a 3 µg de imunógeno CCR7 em 8 locais específicos proximais a linfonodos periféricos (PLN). Este procedimento foi repetido 8 vezes durante um período de 12 dias. No Dia 12, uma sangria de teste foi recolhida e o título de anticorpo no soro foi analisado

por FACS. Em alguns casos, camundongos BALB/c e/ou C57BL/6 foram imunizados com NIH3T3 ou células 300.19 sobre-expressando de forma estável CCR7 humano (SEQ ID NO: 97). Os animais foram injetados por via subcutânea com células 5 $X10^6$ em PBS, uma vez por mês, por 3 meses, seguido de um reforço intravenoso com 25 µg de VLP expressando CCR7 humano. Dois dias após o reforço, foi recolhida uma sangria de teste e o título de anticorpo no soro foi analisado por FACS. Baços e PLNs agrupados foram removidos de camundongos com títulos elevados. Para colher linfócitos, os baços e PLNs foram lavados duas vezes com DMEM e, em seguida dissociados por passagem através de uma peneira de 70 mícrons (Falcon # 352350). Os linfócitos resultantes foram lavados mais 2 vezes antes de fusão em meio Cytofusion (BTXpress Cytofusion® Electroporation Medium cat# 47001).

[00379] Para a fusão, células de mieloma F0 foram misturadas com linfócitos em uma proporção 1:4. A mistura de células foi centrifugada, suspensa em meio Cytofusion e, em seguida, adicionada a uma câmara de eletrofusão (Harvard Apparatus Coaxial chamber 9ML Part #470020). Foi realizada eletrofusão de acordo com as instruções do fabricante, usando o sistema CEEF-50B Hybrimune/Hybridoma (Cyto Pulse Sciences, Inc). Se permitiu que células fundidas recuperassem 5 minutos na câmara, sendo depois diluídas a 1/10 em meio de fusão sem HAT (DMEM + SFB a 20%, Pen/Strep/Glu a 1%, 1X NEAA, 0,5X HFCS) e colocadas a 37°C durante uma hora. Meio 4X HAT (DMEM + SFB a 20%, Pen/Strep/Glu a 1%, 1X NEAA, 4X HAT, 0,5X HFCS) foi adicionado para fazer uma solução 1X e a densidade foi ajustada para 1,67 X 10^4 de células/ml. As células foram colocadas em placas de 384 poços a 60 µl/poço.

Avaliação FACS

[00380] Dez dias após fusão, placas de hibridoma foram avaliadas

quanto à presença de anticorpos específicos de CCR7 usando citometria de fluxo para confirmar ligação específica de anticorpos candidatos a linhagens celulares sobre-expressando de forma estável ou expressando endogenamente CCR7. As células foram lavadas com PBS e cuidadosamente tratadas com Accutase (Millipore #SCR005) para se elevarem de placas de crescimento e ressuspensas em PBS frio. As células foram marcadas por biotinilação com um corante fluorescente de acordo com as instruções do fabricante (FluoReporter Cell-Surface Biotinylation Kit, Thermo Fisher Scientific Cat# F-20650; PE-Cy7 Steptavidin, ThermoFisher Scientific Cat# SA1012). As células foram ressuspensas em aproximadamente $1X10^6$ de células/ml em tampão FACS (1X DPBS, FBS a 3%, EDTA a 5 mM, azida de sódio a 0,1%). Em uma placa de 384 poços, foram pré-inoculados 20 µL de sobrenadante de hibridoma e adicionados 20 µL de suspensão celular. As células foram incubadas durante 1 hora a 4°C, lavadas duas vezes com tampão FACS frio e ressuspensas em 20 µL de 1:400 de tampão FACS de anticorpo secundário (IgG anti-humano de cabra F(ab')2 conjugado com aloficocianina, específico de Fcγ; Jackson, Immunoresearch Cat# 109-136-098). Após incubação adicional de 45 min a 4°C, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e ressuspensas em 20 µL de tampão FACS + 2 µg/ml de iodeto de propídio (Sigma Aldrich Cat#4864-10P ML). A intensidade de fluorescência média geométrica foi calculada em células individuais vivas usando software FlowJo™.

Purificação de anticorpos

[00381] Foram preparados anticorpos quiméricos compreendendo regiões variáveis de murino e regiões constantes humanas. Além disso, versões quiméricas compreendendo mutações de cisteína (por exemplo, cisteínas na posição K360C, ou posições E152C e S375C da cadeia pesada) foram projetadas para conjugação de porção de fár-

maco e preparação de ADC, conforme descrito em maior detalhe neste documento. Sequências de DNA de região variável (VH e VL) de hibridomas foram obtidas para geração de sequências otimizadas (por exemplo, humanização, características preferenciais) para cada um dos hibridomas selecionados mAb121G12, mAb506E15, mAb674J13 e mAb684E12. DNA de região variável de anticorpos monoclonais de murino foi amplificado por RACE a partir de RNA obtido a partir de cada linhagem celular de hibridoma selecionada utilizando métodos padrão. Sequências polipeptídicas para cada uma das cadeias leves/pesadas variáveis de murino são mostradas na SEQ ID NO: 128/SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 160/SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 192/SEQ ID NO: 208 e SEQ ID NO: 224/SEQ ID NO: 240, respectivamente, para cada um dos hibridomas 674J13, 121G12, 506E15 e 684E12. As correspondentes sequências nucleotídicas pesadas/leves variáveis derivadas para cada um dos hibridomas são mostradas em SEQ ID NO: 129/SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 161/SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 193/SEQ ID NO: 209 e SEQ ID NO: 225/SEQ ID NO: 241. Para a preparação de anticorpos quiméricos, sequências de DNA que codificam o hibridoma, os domínios VL e VH foram subclonados em vetores de expressão contendo os respectivos Cys manipulados ou de tipo selvagem humanos ou sequências de região constante de cadeia leve humana e cadeia pesada de mutação D265A/P329A (DAPA) (IgG1, kappa).

Humanização de anticorpos

[00382] Construtos de região variável foram projetados para humanização e otimização de sequências (por exemplo, remoção de modificações pós-translacionais, locais não preferidos, etc.), de modo a incluir mutações de cisteína (por exemplo, cisteínas na posição K360C, ou posições E152C e S375C da cadeia pesada) para conjugação de porção de fármaco e preparação de ADC, conforme descrito em maior

detalhe neste documento; bem como para modificação de mutações de efetor FC (por exemplo, mutações D265A/P329A na região Fc) para incluir construtos tendo função efetora Fc reduzida, e suas combinações.

[00383] Sequências de DNA que codificam domínios VL e VH humanizados foram encomendadas a GeneArt (Life Technologies Inc., Regensburg, Alemanha), incluindo otimização de códons para Cricetulus griseus. Sequências que codificam domínios VL e VH foram subclonadas a partir dos vetores derivados de GeneArt em vetores de expressão adequados para produção de proteínas em células de mamíferos. Cadeias pesadas e leves foram clonadas em vetores de expressão individual para permitir cotransfecção.

[00384] Anticorpos recombinantes (IgG1, kappa) foram produzidos por cotransfecção de vetores em células de expressão Freestyle™ 293 (Invitrogen, E.U.A.) utilizando PE (polietilenimina, 25.000 MW linear, Polysciences, E.U.A., cat# 23966) como reagente de transfecção. O estoque de PEI foi preparado dissolvendo 1 g de PEI em 900 ml de água com grau de cultura celular à temperatura ambiente (TA). Para facilitar a dissolução de PEI, a solução foi acidificada por adição de HCl até pH 3 a 5, seguido de neutralização com NaOH para um pH final de 7,05. Por último, o volume foi ajustado para 1 L e a solução foi esterilizada através de um filtro de 0,22, separada em alíquotas e congelada a -80°C até uso posterior.

[00385] Células Freestyle™ 293 (Gibco™, ThermoFisher scientific, E.U.A., cat# R79007) foram cultivadas em meio Freestyle™ 293 (Gibco™, ThermoFisher scientific, E.U.A., cat# 12338018) em balões de agitação (Corning, Tewksbury, MA) em um agitador orbital (100-120 rpm) em uma incubadora umidificada a 37°C e a 5% de CO_2. Para transfecções transitórias, as células foram cultivadas até uma densidade de aproximadamente 3 x 10^6 células/ml e, em seguida, 1 ug de

DNA esterilizado com filtro/ml de cultura (0,5 ug de cadeia pesada + 0,5 ug de cadeia leve) foi adicionado a 2 ug de PEI/1 µg de DNA em solução OptiMem (ThermoFisher Scientific, E.U.A., #11058021) e incubado à TA durante 8 minutos. A mistura foi adicionada às células Freestyle™ 293 gota a gota, com agitação suave. Após a transfecção, as células foram cultivadas durante uma a duas semanas antes de purificação de anticorpos do sobrenadante. Para gerar linhagens celulares estáveis para produção de anticorpos, os vetores foram cotransfectados por nucleofecção (shuttle™ Nucleofector™ de 96 poços; Lonza) em células CHO utilizando as recomendações do fabricante, e cultivadas sob condições de seleção durante até quatro semanas em balões de agitação. As células foram colhidas por centrifugação e o sobrenadante foi recuperado para purificação de anticorpos. Anticorpo foi purificado utilizando colunas de proteína, Proteína G ou MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences). Antes de carregar o sobrenadante, a resina foi equilibrada com PBS. Após ligação da amostra, a coluna foi lavada com PBS e o anticorpo foi eluído com IgG Thermo (Pierce), pH 2,8 (cat# 21004). As porções de eluato foram neutralizadas com tampão desidratado de citrato de sódio tribásico, pH 8,5 (Sigma Aldrich cat# S4641-1Kg) e, em seguida, dialisadas durante a noite em PBS, pH 7,2.

Sumário de anticorpos

[00386] A Tabela 4 apresenta a sequência de informações relevantes para anticorpos anti-CCR7 parentais e humanizados derivados de hibridomas de murino. Ao longo deste pedido, ao descrever os anticorpos, os termos "Hibridoma" e "Parental" são usados indistintamente e referem-se ao Ab que é derivado do hibridoma.

Tabela 4: Informações de Sequência de Nucleotídeos e de Aminoácidos para Hibridomas e Anticorpos Anti-CCR7 Humanizados

hIgG1 674J13 parental		
SEQ ID NO: 116	HCDR1 (Combinado)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 117	HCDR2 (Combinado)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 118	HCDR3 (Combinado)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 119	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 120	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 121	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 122	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 123	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 124	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 125	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 126	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 127	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 128	VH	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRISIIRDTSKNLFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO: 129	DNA VH	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACT CACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGC

		AGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAAC TACAACCCATCTCTCAAAAGTCGCATCTCTATCATTCGAGACACATCCAAGAACCTGTTC TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGG GGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
SEQ ID NO: 130	Cadeia Pesada (WT Fc)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRISIIRDTSKNLFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSAASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 131	Cadeia Pesada de DNA	gatgtgcagcttcaggagtcaggacctgacctggtgaaaccttctcagtcactttcactcacctgcactgtcactggctactccatcaccag tggttatagctggcactggatccggcagtttccaggaaacaaactggagtggatggcccacatccactccagtggtagcactaactaca acccatctctcaaaagtcgcatctctatcattcgagacacatccaagaacctgttcttcctgcagttgaattctgtgactactgaggacaca gccacatattactgtgcaagaggggggggtacaggcctttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctctgcaGCTAGCAC CAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGC TGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTC TGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCT

		GCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATA CAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 132	LCDR1 (Combinado)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 133	LCDR2 (Combinado)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 134	LCDR3 (Combinado)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 135	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 136	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 137	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 138	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 139	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 140	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL

SEQ ID NO: 141	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 142	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 143	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 144	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK
SEQ ID NO: 145	DNA VL	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG GCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCGGTG CTGGGACCACGTTGGAGCTGAAA
SEQ ID NO: 146	Cadeia Leve	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 147	Cadeia Leve de DNA	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG GCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCGGTG CTGGGACCACGTTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCC

		CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGT GACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
hIgG1 121G12 parental		
SEQ ID NO: 148	HCDR1 (Combinado)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 149	HCDR2 (Combinado)	TISDGGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 150	HCDR3 (Combinado)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 151	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 152	HCDR2 (Kabat)	TISDGGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 153	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 154	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 155	HCDR2 (Chothia)	SDGGSY
SEQ ID NO: 156	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 157	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 158	HCDR2 (IMGT)	ISDGGSYS
SEQ ID NO: 159	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 160	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYSYYP DNVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTSVTVS

		S
SEQ ID NO: 161	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTAC TATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTA TACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACG AGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 162	Cadeia Pesada (WT Fc)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYSYYP DNVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTSVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 163	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTAC TATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTA TACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACG

		AGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCC AGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACG AGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAA GACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCC CAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCT GAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 164	LCDR1 (Combinado)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 165	LCDR2 (Combinado)	YASQSIS

SEQ ID NO: 166	LCDR3 (Combinado)	QQSNSWLT
SEQ ID NO: 167	LCDR1 (Kabat)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 168	LCDR2 (Kabat)	YASQSIS
SEQ ID NO: 169	LCDR3 (Kabat)	QQSNSWLT
SEQ ID NO: 170	LCDR1 (Chothia)	SQSISNN
SEQ ID NO: 171	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 172	LCDR3 (Chothia)	SNSWL
SEQ ID NO: 173	LCDR1 (IMGT)	QSISNN
SEQ ID NO: 174	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 175	LCDR3 (IMGT)	QQSNSWLT
SEQ ID NO: 176	VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPKLLIKYASQSISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWLTFGAGTKLGLK
SEQ ID NO: 177	DNA VL	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAG TCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAGAAATC ACATGAGTCTCCAAAACTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTC CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGA CTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGGGCTGAAA
SEQ ID NO: 178	Cadeia Leve	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPKLLIKYASQSISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWLTFGAGTKLGLKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK

		HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 179	Cadeia Leve de DNA	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAG TCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAGAAATC ACATGAGTCTCCAAAACTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTC CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGA CTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGGGCTGAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCA CCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
hIgG1 506E15 parental		
SEQ ID NO: 180	HCDR1 (Combinado)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 181	HCDR2 (Combinado)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 182	HCDR3 (Combinado)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 183	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 184	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 185	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 186	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY

SEQ ID NO: 187	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 188	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 189	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 190	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 191	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 192	VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIRQTPEKRLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARRASTVVGTDFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 193	DNA VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGATTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATTTCTAGAGACAATGTCAAGAACACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAC GGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 194	Cadeia Pesada (WT Fc)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIRQTPEKRLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARRASTVVGTDFDVWGAGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC

		SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 195	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGATTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATTTCTAGAGACAATGTCAAGAACACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAC GGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGC CCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGC TCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCA GCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGA GGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC CTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC

		CAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 196	LCDR1 (Combinado)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 197	LCDR2 (Combinado)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 198	LCDR3 (Combinado)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 199	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 200	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 201	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 202	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 203	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 204	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 205	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 206	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 207	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 208	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFS GSRSGSDYSLTISSLESEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 209	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG TCTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAAACTGGCTTCAGCAGGAAC CAGATGGAACTATTAAACGCCTGATCTATGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCA

		AAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAG TCTGAAGATTTTGTAGTCTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 210	Cadeia Leve	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFS GSRSGSDYSLTISSLESEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 211	Cadeia Leve de DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG TCTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAAACTGGCTTCAGCAGGAAC CAGATGGAACTATTAAACGCCTGATCTATGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCA AAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAG TCTGAAGATTTTGTAGTCTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
hIgG1 684E12 parental		

SEQ ID NO: 212	HCDR1 (Combinado)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 213	HCDR2 (Combinado)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 214	HCDR3 (Combinado)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 215	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 216	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 217	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 218	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 219	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 220	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 221	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 222	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 223	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK
SEQ ID NO: 224	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 225	DNA VH	gaagtgcatctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttca gtaactttgccatgtcttgggttcgccagactccggagaagagactggagtgggtcgcaaccattagtactggtggtacttacaccta ctatccagacagtgtgaagggtcgattcaccatctccagagacaatgccaagaaaaccctgtacctgcaaatgagcagtctgag gtctgaggacacggccatgtattactgtacaagacgggggtacgacggcgtggacaaatggggccaaggcaccactctcacag tctcctca
SEQ ID NO: 226	Cadeia Pesada (WT Fc)	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSSASTKG

		PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 227	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACTGGTGGTACTTACACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGAC GGGGGTACGACGGCGTGGACAAATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgct agcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgccctgggttgcctggtgaa ggactacttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcaga gcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacgtgaacca caagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccctgcccag ctccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggt gacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacg ccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggct gaacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagg gccagccacgggagccccaggtgtacaccctgcccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtct

		ggtgaagggcttctaccccagcgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc cccagtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgtt cagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
SEQ ID NO: 228	LCDR1 (Combinado)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 229	LCDR2 (Combinado)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 230	LCDR3 (Combinado)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 231	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 232	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 233	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 234	LCDR1 (Chothia)	GQSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 235	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 236	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 237	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 238	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 239	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 240	VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 241	DNA VL	gatgttgtgatgacccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctccatctcttgcaagtcaggtcagagcctctt agatagtgatggaaagacatatttgaattggtttttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctggtgtctaaactg gactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatt tgggagtttattattgctggcaaggtacacattttcctcagacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaa

SEQ ID NO: 242	Cadeia Leve	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 243	Cadeia Leve de DNA	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCC ATCTCTTGCAAGTCAGGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGG TTTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTC CTCAGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatctt ccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacccccgggaggccaag gtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccac ctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccag ggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
CysMab hIgG1 674J13 parental		
SEQ ID NO: 244	HCDR1 (Combinado)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 245	HCDR2 (Combinado)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 246	HCDR3 (Combinado)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 247	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH

SEQ ID NO: 248	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 249	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 250	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 251	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 252	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 253	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 254	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 255	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 256	VH	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRISIIRDTSKNLFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO: 257	DNA VH	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACT CACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGC AGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAAC TACAACCCATCTCTCAAAAGTCGCATCTCTATCATTCGAGACACATCCAAGAACCTGTTC TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGG GGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
SEQ ID NO: 258	Cadeia Pesada (Mutações Cys Mab sublinhadas)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRISIIRDTSKNLFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSAASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

		HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 259	Cadeia Pesada de DNA	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACT CACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGC AGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAAC TACAACCCATCTCTCAAAAGTCGCATCTCTATCATTCGAGACACATCCAAGAACCTGTTC TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGG GGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAgctagca ccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgccctgggttgcctggtgaaggac tacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagcagcg gcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacgtgaaccacaagcc cagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccctgcccagctccag aactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctg cgtggtggtggacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaaga ccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacgg caaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagggccagc cacgggagccccaggtgtacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaag ggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccagtgct ggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcag cgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaag

SEQ ID NO: 260	LCDR1 (Combinado)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 261	LCDR2 (Combinado)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 262	LCDR3 (Combinado)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 263	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 264	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 265	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 266	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 267	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 268	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 269	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 270	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 271	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 272	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK
SEQ ID NO: 273	DNA VL	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG GCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCGGTG CTGGGACCACGTTGGAGCTGAAA
SEQ ID NO: 274	Cadeia Leve	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS

		GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 275	Cadeia Leve de DNA	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG GCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCGGTG CTGGGACCACGTTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGT GACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
CysMab DAPA hIgG1 674J13 parental		
SEQ ID NO: 276	HCDR1 (Combinado)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 277	HCDR2 (Combinado)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 278	HCDR3 (Combinado)	GGVQAFAY

SEQ ID NO: 279	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 280	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 281	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 282	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 283	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 284	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 285	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 286	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 287	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 288	VH	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 289	DNA VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTGAAACCCTCCCAGACCCTGTCCC TGACCTGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTGGATCCG GCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACC AACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGACACCTCCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GAGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTC C
SEQ ID NO: 290	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, Cys-	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

	Mab)	VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 291	Cadeia Pesada de DNA	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTGAAACCCTCCCAGACCCTGTCCC TGACCTGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTGGATCCG GCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACC AACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGACACCTCCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GAGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTC CGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGACAG TGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC

		AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGGCTGC CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGG TGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC AAG
SEQ ID NO: 292	LCDR1 (Combinado)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 293	LCDR2 (Combinado)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 294	LCDR3 (Combinado)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 295	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 296	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 297	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 298	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 299	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 300	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 301	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 302	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 303	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 304	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARF

		SGSGSGTDYTLTISSMEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 305	DNA VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGCGTGA CAATGTCCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCC GCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGA ACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCTGACCTTC GGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 306	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARF SGSGSGTDYTLTISSMEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 307	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGCGTGA CAATGTCCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCC GCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGA ACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCTGACCTTC GGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA GCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA

		GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
CysMab hIgG1 121G12 parental		
SEQ ID NO: 308	HCDR1 (Combinado)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 309	HCDR2 (Combinado)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 310	HCDR3 (Combinado)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 311	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 312	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 313	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 314	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 315	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 316	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 317	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 318	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 319	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 320	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYSYYPDNVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 321	DNA VH (mutações sublinha-	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA

	das de CysMab)	CTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTAC TATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTA TACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACG AGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 322	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de CysMab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYSYYP DNVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTSVTVS Sastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfp**C**pvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnh kpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnakt kpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfyp**C**d iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
SEQ ID NO: 323	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTAC TATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTA TACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACG AGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCCTCAgctagcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctg ccctgggttgcctggtgaaggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttc cccgccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctat atctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacac

		ctgccccccctgcccagctccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatca gcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggc gtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgc tgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaat cagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaact acaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcag cagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccgg caag
SEQ ID NO: 324	LCDR1 (Combinado)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 325	LCDR2 (Combinado)	YASQSIS
SEQ ID NO: 326	LCDR3 (Combinado)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 327	LCDR1 (Kabat)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 328	LCDR2 (Kabat)	YASQSIS
SEQ ID NO: 329	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 330	LCDR1 (Chothia)	SQSISNN
SEQ ID NO: 331	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 332	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 333	LCDR1 (IMGT)	QSISNN
SEQ ID NO: 334	LCDR2 (IMGT)	YAS

SEQ ID NO: 335	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 336	VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPKLLIKYASQSISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWLTFGAGTKLGLK
SEQ ID NO: 337	DNA VL	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAG TCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAGAAATC ACATGAGTCTCCAAAACTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTC CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGA CTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGGGCTGAAA
SEQ ID NO: 338	Cadeia Leve	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPKLLIKYASQSISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWLTFGAGTKLGLKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 339	Cadeia Leve de DNA	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAG TCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAGAAATC ACATGAGTCTCCAAAACTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTC CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGA CTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGGGCTGAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC

		AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCA CCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
CysMab DAPA hIgG1 121G12 parental		
SEQ ID NO: 340	HCDR1 (Combinado)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 341	HCDR2 (Combinado)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 342	HCDR3 (Combinado)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 343	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 344	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 345	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 346	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 347	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 348	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 349	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 350	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 351	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 352	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDAGSYSYY PDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTTVTV

		SS
SEQ ID NO: 353	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGGTGCGGC AGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTC CTACTACCCCGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCGTGACAGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 354	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, Cys-Mab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDAGSYSYY PDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 355	Cadeia Pesada de DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGGTGCGGC AGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTC CTACTACCCCGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC

		CAGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCGTGACAGTGTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTT CCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGT CCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAA CAAGGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGG GAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 356	LCDR1 (Combinado)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 357	LCDR2 (Combinado)	YASQSIS

SEQ ID NO: 358	LCDR3 (Combinado)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 359	LCDR1 (Kabat)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 360	LCDR2 (Kabat)	YASQSIS
SEQ ID NO: 361	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 362	LCDR1 (Chothia)	SQSISNN
SEQ ID NO: 363	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 364	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 365	LCDR1 (IMGT)	QSISNN
SEQ ID NO: 366	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 367	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 368	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 369	DNA VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAGAGTGA CCCTGTCCTGCCGGGCCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCC CTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGT GGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCG GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 370	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK

		HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 371	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAGAGTGA CCCTGTCCTGCCGGGCCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCC CTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGT GGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCG GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA GCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
CysMab hIgG1 506E15 parental		
SEQ ID NO: 372	HCDR1 (Combinado)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 373	HCDR2 (Combinado)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 374	HCDR3 (Combinado)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 375	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 376	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 377	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV

SEQ ID NO: 378	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 379	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 380	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 381	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 382	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 383	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 384	VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIRQTPEKRLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARRASTVVGTDFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 385	DNA VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGATTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATTTCTAGAGACAATGTCAAGAACACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAC GGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 386	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de CysMab)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIRQTPEKRLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARRASTVVGTDFDVWGAGTTVTVSSa stkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpCpvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkps ntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypCdiave wesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

SEQ ID NO: 387	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGATTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATTTCTAGAGACAATGTCAAGAACACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAC GGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCAgctagcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgc cctgggttgcctggtgaaggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttcc ccgccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatat ctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacct gccccccctgcccagctccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcag caggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcg tggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgct gcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaat cagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaact acaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcag cagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccgg caag
SEQ ID NO: 388	LCDR1 (Combinado)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 389	LCDR2 (Combinado)	ATSSLDS

SEQ ID NO: 390	LCDR3 (Combinado)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 391	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 392	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 393	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 394	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 395	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 396	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 397	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 398	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 399	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 400	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFS GSRSGSDYSLTISSLESEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 401	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG TCTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAAACTGGCTTCAGCAGGAAC CAGATGGAACTATTAAACGCCTGATCTATGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCA AAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAG TCTGAAGATTTTGTAGTCTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 402	Cadeia Leve	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFS GSRSGSDYSLTISSLESEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

		KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 403	Cadeia Leve de DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG TCTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAAACTGGCTTCAGCAGGAAC CAGATGGAACTATTAAACGCCTGATCTATGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCA AAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAG TCTGAAGATTTTGTAGTCTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
CysMab DAPA hIgG1 506E15 parental		
SEQ ID NO: 404	HCDR1 (Combinado)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 405	HCDR2 (Combinado)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 406	HCDR3 (Combinado)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 407	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 408	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 409	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 410	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 411	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 412	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 413	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 414	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 415	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 416	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 417	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATCCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAC CGTGACAGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 418	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, Cys-Mab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

		VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 419	Cadeia Pesada de DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATCCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAC CGTGACAGTGTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CTGTCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTC CAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTG CCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAA GGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAG

		CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC CTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 420	LCDR1 (Combinado)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 421	LCDR2 (Combinado)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 422	LCDR3 (Combinado)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 423	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 424	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 425	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 426	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 427	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 428	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 429	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 430	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 431	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 432	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFS GSRSGTDYTLTISSLQPEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 433	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGAGTGA

		CCCTGACCTGCCGGGCCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCAGCAGAA GCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTG CCCTCCCGGTTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTACTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACC TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 434	Cadeia Leve	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFS GSRSGTDYTLTISSLQPEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 435	Cadeia Leve de DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGAGTGA CCCTGACCTGCCGGGCCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCAGCAGAA GCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTG CCCTCCCGGTTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTACTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACC TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCA TCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC

CysMab hIgG1 684E12 parental		
SEQ ID NO: 436	HCDR1 (Combinado)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 437	HCDR2 (Combinado)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 438	HCDR3 (Combinado)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 439	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 440	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 441	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 442	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 443	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 444	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 445	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 446	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 447	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK
SEQ ID NO: 448	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 449	DNA VH	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACTGGTGGTACTTACACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCT

		GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGAC GGGGGTACGACGGCGTGGACAAATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 450	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de CysMab)	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSSastkgp svfplapsskstsggtaalgclvkdyfpCpvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvd krvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyn styrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypCdiavewesn gqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
SEQ ID NO: 451	Cadeia Pesada de DNA (mutações sublinhadas de CysMab)	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACTGGTGGTACTTACACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGAC GGGGGTACGACGGCGTGGACAAATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgct agcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgccctgggttgcctggtgaa ggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacgtgaaccaca agcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccctgcccagct ccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtg acctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgc caagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctg

		aacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaaggg ccagccacgggagccccaggtgtacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctg gtgaagggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccc agtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcag ctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
SEQ ID NO: 452	LCDR1 (Combinado)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 453	LCDR2 (Combinado)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 454	LCDR3 (Combinado)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 455	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 456	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 457	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 458	LCDR1 (Chothia)	GQSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 459	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 460	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 461	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 462	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 463	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 464	VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 465	DNA VL	gatgttgtgatgacccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctccatctcttgcaagtcaggtcagagcctctt agatagtgatggaaagacatatttgaattggtttttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctggtgtctaaactg

		gactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatt tgggagtttattattgctggcaaggtacacattttcctcagacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaa
SEQ ID NO: 466	Cadeia Leve	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 467	Cadeia Leve de DNA	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCC ATCTCTTGCAAGTCAGGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGG TTTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTC CTCAGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatctt ccccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacccccgggaggccaag gtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccac ctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccag ggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
CysMab DAPA hIgG1 684E12 parental		
SEQ ID NO: 468	HCDR1 (Combinado)	GFTFSNFAMS

SEQ ID NO: 469	HCDR2 (Combinado)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 470	HCDR3 (Combinado)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 471	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 472	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 473	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 474	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 475	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 476	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 477	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 478	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 479	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK
SEQ ID NO: 480	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 481	DNA VH	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACTGGTGGTACTTACACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGAC GGGGGTACGACGGCGTGGACAAATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 482	Cadeia Pesada (mutações sublinha-	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTPEKRLEWVATISTGGTYTYYP DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTLTVSSASTKG

	das de DAPA, Cys-Mab)	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 483	Cadeia Pesada de DNA	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGA CTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACTGGTGGTACTTACACCTAC TATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGAC GGGGGTACGACGGCGTGGACAAATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgct agcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgccctgggttgcctggtgaa ggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacgtgaaccaca agcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccctgcccagct ccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtg acctgcgtggtggtggccgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgc caagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctg aacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctggctgccccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagggc cagccacgggagccccaggtgtacaccctgcccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggt

		gaagggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccca gtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagct gcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
SEQ ID NO: 484	LCDR1 (Combinado)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 485	LCDR2 (Combinado)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 486	LCDR3 (Combinado)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 487	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 488	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 489	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 490	LCDR1 (Chothia)	GQSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 491	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 492	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 493	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDGKTY
SEQ ID NO: 494	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 495	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 496	VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 497	DNA VL	gatgttgtgatgacccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctccatctcttgcaagtcaggtcagagcctctt agatagtgatggaaagacatatttgaattggtttttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctggtgtctaaactg gactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatt tgggagtttattattgctggcaaggtacacattttcctcagacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaa

SEQ ID NO: 498	Cadeia Leve	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSGQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 499	Cadeia Leve de DNA	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCC ATCTCTTGCAAGTCAGGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGG TTTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTC CTCAGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatctt ccccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacccccgggaggccaag gtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccac ctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccag ggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
DAPA hIgG1 674J13 humani-zado		
SEQ ID NO: 500	HCDR1 (Combinado)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 501	HCDR2 (Combinado)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 502	HCDR3 (Combinado)	GGVQAFAY

SEQ ID NO: 503	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 504	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 505	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 506	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 507	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 508	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 509	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 510	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 511	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 512	VH	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 513	DNA VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTGAAACCCTCCCAGACCCTGTCCC TGACCTGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTGGATCCG GCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACC AACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGACACCTCCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GAGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTC C
SEQ ID NO: 514	Cadeia Pesada (mutações sublinha-das de DAPA)	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

		VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVaVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALaAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 515	Cadeia Pesada de DNA	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTGAAACCCTCCCAGACCCTGTCCC TGACCTGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTGGATCCG GCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATGGCCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACC AACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGACACCTCCAAGAACCA GTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GAGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTC CGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAG TGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC

		AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGGCTGC CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGG TGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC AAG
SEQ ID NO: 516	LCDR1 (Combinado)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 517	LCDR2 (Combinado)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 518	LCDR3 (Combinado)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 519	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 520	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 521	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 522	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 523	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 524	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 525	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 526	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 527	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 528	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARF

		SGSGSGTDYTLTISSMEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 529	DNA VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGCGTGA CAATGTCCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCC GCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGA ACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCTGACCTTC GGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 530	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVIYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARF SGSGSGTDYTLTISSMEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 531	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGCGTGA CAATGTCCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCC GCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGA ACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCTGACCTTC GGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCT TCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA GCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA

		GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
DAPA hIgG1 121G12 humani-zado		
SEQ ID NO: 532	HCDR1 (Combinado)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 533	HCDR2 (Combinado)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 534	HCDR3 (Combinado)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 535	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 536	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 537	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 538	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 539	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 540	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 541	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 542	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 543	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 544	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDAGSYSYY PDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTTVTV SS
SEQ ID NO: 545	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA

		CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGGTGCGGC AGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTC CTACTACCCCGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCGTGACAGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 546	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDAGSYSYY PDNVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEEYYVMDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**a**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**a**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 547	Cadeia Pesada de DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGGTGCGGC AGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTC CTACTACCCCGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCGTGACAGTGTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCA

		GCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGT CCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAA CAAGGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGG GAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 548	LCDR1 (Combinado)	RASQSISNNLH
SEQ ID NO: 549	LCDR2 (Combinado)	YASQSIS
SEQ ID NO: 550	LCDR3 (Combinado)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 551	LCDR1 (Kabat)	RASQSISNNLH

SEQ ID NO: 552	LCDR2 (Kabat)	YASQSIS
SEQ ID NO: 553	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 554	LCDR1 (Chothia)	SQSISNN
SEQ ID NO: 555	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 556	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 557	LCDR1 (IMGT)	QSISNN
SEQ ID NO: 558	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 559	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 560	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 561	DNA VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAGAGTGA CCCTGTCCTGCCGGGCCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCC CTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGT GGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCG GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 562	Cadeia Leve	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 563	Cadeia Leve de DNA	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAGAGTGA

		CCCTGTCCTGCCGGGCCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCC CTGCCAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGT GGAACCCGAGGACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCG GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA GCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
DAPA hIgG1 506E15 humani-zado		
SEQ ID NO: 564	HCDR1 (Combinado)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 565	HCDR2 (Combinado)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 566	HCDR3 (Combinado)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 567	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 568	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 569	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 570	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY

SEQ ID NO: 571	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 572	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 573	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 574	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 575	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 576	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 577	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATCCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAC CGTGACAGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 578	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVATISSGGSFTYYP DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDFDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**a**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**a**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC

		SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 579	Cadeia Pesada de DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATCCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAC CGTGACAGTGTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTC CCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCT GCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAA GGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGA GCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA

		ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 580	LCDR1 (Combinado)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 581	LCDR2 (Combinado)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 582	LCDR3 (Combinado)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 583	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 584	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 585	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 586	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 587	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 588	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 589	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 590	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 591	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 592	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFS GSRSGTDYTLTISSLQPEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 593	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGAGTGA CCCTGACCTGCCGGGCCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCAGCAGAA GCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTG

		CCCTCCCGGTTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTACTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACC TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 594	Cadeia Leve	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFS GSRSGTDYTLTISSLQPEDFVVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 595	Cadeia Leve de DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGAGTGA CCCTGACCTGCCGGGCCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCAGCAGAA GCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTACGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTG CCCTCCCGGTTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTACTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACC TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCA TCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
CysMab DAPA		

hIgG1 684E12 humanizado		
SEQ ID NO: 596	HCDR1 (Combinado)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 597	HCDR2 (Combinado)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 598	HCDR3 (Combinado)	RGYSGVDK
SEQ ID NO: 599	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 600	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 601	HCDR3 (Kabat)	RGYSGVDK
SEQ ID NO: 602	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 603	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 604	HCDR3 (Chothia)	RGYSGVDK
SEQ ID NO: 605	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 606	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 607	HCDR3 (IMGT)	TRRGYSGVDK
SEQ ID NO: 608	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISTGGTYTYY PDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGYSGVDKWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 609	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACTTCGCCATGTCCTGGGTGCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCACCATCTCCACCGGCGGCACCTACACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC

		CAGACGGGGCTACTCAGGCGTGGACAAATGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTC CTCC
SEQ ID NO: 610	Cadeia Pesada (mutações sublinhadas de DAPA, Cys-Mab)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISTGGTYTYY PDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGYSGVDKWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP**C**PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYP**C**DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 611	Cadeia Pesada de DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAACCCGGCGGATCCCTGAGA CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACTTCGCCATGTCCTGGGTGCGGCA GGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCACCATCTCCACCGGCGGCACCTACACC TACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACT CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGGCTACTCAGGCGTGGACAAATGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTC CTCCgctagcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggcccccagcagcaagtctacttccggcggaactgctgccctgggttg cctggtgaaggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgccgtg ctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacg tgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccc tgcccagctccagaactgctgggagggccttccgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggaccc

		ccgaggtgacctgcgtggtggtggccgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc acaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccagg actggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctggctgccccaatcgaaaagacaatcagcaaggc caagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgac ctgtctggtgaagggcttctacccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccac ccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacg tgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
SEQ ID NO: 612	LCDR1 (Combinado)	KSGQSLLDSTGKTYLN
SEQ ID NO: 613	LCDR2 (Combinado)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 614	LCDR3 (Combinado)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 615	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLLDSTGKTYLN
SEQ ID NO: 616	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 617	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 618	LCDR1 (Chothia)	GQSLLDSTGKTY
SEQ ID NO: 619	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 620	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 621	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSTGKTY
SEQ ID NO: 622	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 623	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 624	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSGQSLLDSTGKTYLNWFLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 625	DNA VL	GACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCTGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCT CCATCTCCTGCAAGTCCGGCCAGTCCCTGCTGGACTCCACTGGCAAGACCTACCTGAAC TGGTTCCTGCAGCGGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACCTGGTGTCCAAGC TGGACAGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTGGCAGGGCAC CCACTTCCCCCAGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 626	Cadeia Leve	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSGQSLLDSTGKTYLNWFLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 627	Cadeia Leve de DNA	GACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCTGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCT CCATCTCCTGCAAGTCCGGCCAGTCCCTGCTGGACTCCACTGGCAAGACCTACCTGAAC TGGTTCCTGCAGCGGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACCTGGTGTCCAAGC TGGACAGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTGGCAGGGCAC CCACTTCCCCCAGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGcgtacggtggccgctccc agcgtgttcatcttccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacccccc gggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacag caaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcataaggtgtacgcctgcgag gtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc

Exemplo 2: *Avaliação in vitro* de Atividade ADCC Induzida por Anticorpos

[00387] A capacidade de anticorpos candidatos para mediar ADCC foi avaliada utilizando um ensaio repórter ADCC substituto. Células JVM2 expressando CCR7 e CD20 foram utilizadas como células alvo. Células JVM2 foram lavadas e ressuspensas em $8x10^4$ células/ml. As células efetoras neste ensaio foram uma linhagem celular Jurkat expressando de forma estável CD16V158 e um repórter luciferase dependente de NFAT (Jurkat-V158); a expressão de luciferase é um substituto para sinalização de ADCC canônica através de CD16. Resumidamente, células Jurkat-V158 cultivadas em suspensão foram centrifugadas para remover meio gasto, o pélete foi ressuspenso em meio de ensaio e ajustado para $1,6x10^6$ células/ml. Misturar volumes iguais de células efetoras e alvo para fazer uma mistura *máster* de células dando origem a uma razão de células efetoras para células alvo de 1:5 ou 1:20. Uma titulação de anticorpos foi diluída em meio de ensaio com uma concentração máxima final de 50 ug/mL no poço de ensaio. 12,5 uL de solução Ab foram adicionados a uma placa de fundo redondo com 384 poços e, em seguida, foram adicionados 12,5 ul da mistura celular *máster*. Anticorpo e células foram bem misturados por pipetagem e incubados durante 4 horas a 37°C em CO_2 a 5%. Após a incubação, 15 uL de substrato Bright Glo (Promega #G7572) foram adicionados a cada poço e agitados por 5 min à TA a 1050 rpm. O sinal luminescente foi lido no leitor de placas Envision (Perkin Elmer).

[00388] Um anticorpo visando CD20 foi incluído como controle positivo e mostrou sinalização NFAT substancial, conforme medido por atividade de luciferase. Da mesma forma, os anticorpos anti-CCR7 candidatos induziram atividade ADCC significativa (Figura 1).

[00389] A tabela abaixo resume os resultados representativos para os vários formatos de anticorpo executados no ensaio ADCC usando células JVM2 e Jurkat-V158.

Tabela 5: Atividade ADCC de anticorpos anti-CCR7 humanizados e não humanizados

	Atividade ADCC; IC50 (nM)
CysMab não humanizado 121G12	0,077
CysMab não humanizado 506E15	0,131
CysMab não humanizado 674J13	1,09
CysMab não humanizado 684E12	2,63
CysMab humanizado 121G12	Sim, mas ajuste de curva insuficiente
CysMab humanizado 506E15	0,054
CysMab humanizado 674J13	Sim, mas ajuste de curva insuficiente
ADCC de controle CD20	0,132

[00390] O ensaio ADCC foi executado com anticorpo não humanizado 506E15 como representante de anticorpo anti-CCR7 capaz de ADCC em várias linhagens celulares, com uma gama de números de receptor CCR7 para determinar a densidade de receptor mínima necessária para atividade ADCC e se existe uma margem de segurança suficiente sobre células T CCR7+ normais. A tabela abaixo resume alguns dos dados.

Tabela 6: Atividade ADCC de anticorpo 506E15 não humanizado

Linhagem celular	Receptor de CCR7 No.	506E15 IC50 (nM)	506E15 (RLU máx.)
JVM2	66.500	0,046	5840
MOTN-1	64.600	0,077	5387
DEL	62.000	0,074	6480
CMLT-1	29.000	0,011	4400
SR786	27.800	0,011	4067
PEER	8.700	0,038	3360
ALL-SIL	6.200	0,008	3720
Jurkat V158	3.400	0,004	3267
DND-41	1.700	0,002	3733
Células T normais	< 1,5 K	depleção *in vivo*	n.a.

[00391] Os dados mostram que mesmo níveis de receptor de CCR7 muito baixos comparáveis a níveis de receptor de CCR7 em células T

normais foram suficientes para permitir atividade ADCC significativa. ADCC também foi avaliada usando um ensaio de viabilidade de cocultura de células NK com células cancerígenas CCR7+ e descobertas semelhantes foram coletadas (não discutidas aqui).

[00392] Isso se encaixa na observação descrita abaixo de que a depleção de células T foi observada *in vivo* e descoberta como sendo baseada em um mecanismo ADCC. Essas descobertas demonstram que a modalidade ADCC não é adequada para CCR7 a partir de uma perspectiva de segurança. Como consequência, todos os candidatos foram passados para o formato Fc silencioso (DAPA) para melhorar a segurança global no alvo.

[00393] O ensaio repórter *in vitro* ADCC foi repetido e confirmou a falta de atividade ADCC para as versões Fc-mutadas DAPA dos anticorpos anti-CCR7 não humanizados (Figura 2).

Exemplo 3: Caracterização Bioquímica de Anticorpos

Afinidades de anticorpos anti-CCR7 para CCR7

[00394] A afinidade de vários anticorpos e ADC para CCR7 e suas espécies ortólogas foi determinada usando FACS. IgGs purificadas foram tituladas para determinar valores EC50 para ligação a CCR7 expresso na superfície celular.

[00395] Para este propósito, células positivas CCR7 foram colhidas (as células aderentes foram destacadas com Accutase), lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS/ FCS a 3%/ azida de sódio a 0,02%) e diluídas para aproximadamente 2 x 10^6 células/ml em tampão FACS. Todas as etapas subsequentes foram efetuadas em gelo para impedir a internalização do receptor. 100 µl da suspensão celular/poço foram transferidos para placas de fundo em U com 96 poços (Falcon). 2 x 10^5 células/poço foram incubadas com uma diluição em série de concentrações de anticorpos do anticorpo de interesse anti-CCR7 variando entre diferentes logs, começando com uma alta de 100 nM para 60

minutos a 4°C, agitando suavemente. Após a incubação, as células foram centrifugadas (1200 rpm, 2 min, 4°C) e lavadas três vezes com tampão FACS. Um anticorpo de detecção conjugado com fluoróforo gama-APC anti-hFc (Jackson ImmunoResearch) foi adicionado a 1:400 e foram incubadas amostras durante1 h no gelo, no escuro, agitadas suavemente. Após uma lavagem final, as células foram ressuspensas em 100 µl de tampão FACS contendo 0,2 µg/ml de DAPI seguido de leitura na máquina de citometria de fluxo (BD LSRFortessa Cell Analyzer; Cat # 647177). A intensidade de fluorescência média (IFM) de células individuais vivas foi calculada em Flowjo 10.0.8 e exportada para Graphpad Prism6 para determinação de EC50.

[00396] A seletividade foi avaliada medindo afinidades de ligação aparente a pares de células isogênicas manipuladas para sobre-expressar CCR7, bem como linhagens celulares expressando parálogos de CCR7, por exemplo, CCR9, CCR6, CXCR4 e CCR8. Todos os anticorpos anti-CCR7 se ligam de uma maneira específica a células que expressam CCR7, como mostrado na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7: Ligação de vários Anticorpos Anti-CCR7 a Células Que Expressam CCR7

	Ligação aparente de FACS (a 5µg/ml).			
Anticorpo CysMab humanizado (Fc de tipo selvagem)	121G12	506E15	674J13	684E12
Células NIH3T3	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação
NIH3T3.hCCR7	Ligação	Ligação	Ligação	Ligação
Células PF382 (CCR7-/CCR9+/ CCR6+)	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação
HEK293-CXCR4	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação
CHO-CCR8	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação

[00397] Em um experimento semelhante, os anticorpos foram testados quanto a reatividade cruzada utilizando conjuntos de linhagem

celular correspondentes isogênicos manipulados (série NIH3T3) e células T CD4+, que foram purificados a partir de vários lotes de PBMC de doadores saudáveis, bem como de macacos cinomolgos, ratos Wistar e camundongos CD-1. Foi descoberto que todos os anticorpos se ligam especificamente a CCR7 humano e de macacos cinomolgos com afinidades aparentes similares, como mostram as Tabelas 8 e 9 abaixo. Apenas o anticorpo 121G12 não humanizado apresenta reatividade cruzada a roedor.

Tabela 8: Reatividade Cruzada de Vários Anticorpos Anti-CCR7 Não Humanizados

	Afinidade Aparente de FACS; EC50 (nM)			
Anticorpo CysMab não humanizado	121G12	506E15	674J13	684E12
Células T CD4+ humanas	22-30	4,6-9,7	0,39-1,4	n.d.
Células T CD4+ de cinomolgo	5,8-12	6,6	0,45	n.d.
Células T CD4+ de camundongo	48-51	Sem ligação	Sem ligação	n.d.
Células T CD4+ de rato	18-31	Sem ligação	Sem ligação	n.d.
NIH3T3.humano CCR7	1,3	n.d.	3,6	>30
NIH3T3.cinomolgo CCR7	1,3	n.d.	n.d.	Ligação
NIH3T3.camundongo CCR7	2,5	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação
NIH3T3.rato CCR7	2,4	Sem ligação	Sem ligação	Sem ligação
Células cancerígenas Jeko-1 (CCR7+)	1,5	n.d.	n.d.	12

Tabela 9: Reatividade Cruzada de Vários Anticorpos Anti-CCR7 Humanizados

	Afinidade Aparente de FACS; EC50 (nM)			
Anticorpo CysMab humanizado	121G12	506E15	674J13	684E12
Células T CD4+ humanas	30-34	7,8-11	0,87-2,7	6,7
Células T CD4+ de cinomolgo	12	7	0,5	n.d.
NIH3T3.humano CCR7	1	n.d.	n.d.	n.d.
NIH3T3.cinomolgo CCR7	0,9	n.d.	n.d.	n.d.

[00398] Para determinar o impacto da densidade do receptor na afinidade aparente e, portanto, a contribuição que a avidez tem para a ligação celular do anticorpo, foram realizados experimentos de titulação FACS em linhagens celulares de câncer que expressam CCR7 humano com variados níveis de expressão e células T derivadas de PBMC CCR7-positivas. Foi realizada quantificação de receptor através de FACS usando microesferas de Bangs Laboratories como padrões de contagem e seguindo as instruções do fabricante. Os resultados exemplificativos são mostrados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10: Contribuição da Avidez para a Afinidade Aparente em Correlação com a Densidade do Receptor

		Afinidade Aparente de FACS; EC50 (nM)			
Anticorpo CysMab.DAPA humanizado	Densidade do receptor CCR7	121G12	506E15	674J13	684E12
Células NIH3T3.hCCR7	>1.000.000	2,5	1,8	0,64	n.d.
Células cancerígenas DEL	~100.000	1,78	3,09	0,47	n.d.
Células T CD4+ humanas	<2.000	~30	~10	~2	~7

[00399] Todos os anticorpos anti-CCR7 mostram contribuição substancial da avidez para a afinidade aparente e força de ligação reduzida em correlação com a densidade do receptor. Em particular, 121G12 mostra ligação significativamente mais fraca a células com baixa expressão de CCR7, como representado por células T CD4+ normais em comparação com células cancerígenas DEL representativas da indicação.

[00400] A afinidade relativamente fraca em particular de 121G12, o qual mostra o maior efeito de avidez entre os anticorpos anti-CCR7, é ideal para utilizar a diferença de densidade de receptor entre células normais e células cancerígenas como forma de influenciar a ligação de anticorpos a células cancerígenas.

Ligação a hCCR7 recombinante em ELISA

[00401] A ligação e a afinidade foram também avaliadas em um ensaio de base ELISA utilizando CCR7 recombinante (Origene #TP306614). Placas com 384 poços Maxisorp™ (Thermo Nunc) foram revestidas com 3,5 µg/ml de CCR7 recombinante diluído em PBS. Após o bloqueio com BSA a 3% (albumina sérica bovina) em PBS durante 1 h à temperatura ambiente e lavagem das placas 3x com PBS-T (0,01% de Tween 20 em PBS), anticorpos primários foram adicionados em uma diluição em série e incubados durante 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e foram detectados anticorpos ligados por incubação com 1:5000 de gama anti-hFc conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP; Jackson ImmunoResearch, Cat#115-035-098) durante 1h à temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS-T e, em seguida, adição de substrato de Peroxidase SureBlue (KPL, #52-00-03). Após 15 min, a absorbância a 650 nM foi registrada e analisada em GraphPad Prism6.

[00402] Todos os anticorpos anti-CCR7 testados são capazes de se ligarem a hCCR7 recombinante (Tabela 11; Figura 3).

Tabela 11: Afinidade de Ligação de Anticorpos Anti-CCR7 Humanizados para hCCR7 recombinante

Anticorpo CysMab humanizado	Afinidade, Kd (nM)
121G12.DAPA	0,677
506E15.DAPA	5,731
674J13.DAPA	0,006

Ligação a FabGraft dual

[00403] Foi realizado um ELISA FabGraft para avaliar a ligação a um espaço de epitopo mínimo, que compreende o terminal N e EC2 de CCR7. Em suma, placas com 384 poços Maxisorp™ (Thermo Nunc) foram revestidas com 5 µg/ml de FabGraft. De outro modo, foram seguidas as instruções de protocolo genérico de ELISA, conforme des-

crito acima. Todos os anticorpos anti-CCR7 são capazes de se ligarem a FabGraft dual, conforme mostrado na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12: Afinidade de Ligação de Anticorpos Anti-CCR7 Humanizados para FabGraft

Anticorpo CysMab humanizado	ELISA; Kd (nM)
121G12.DAPA	0,023
506E15.DAPA	0,025
674J13.DAPA	0,023

Análise ELISA da dependência de pH com VLPS

[00404] É sabido que o CCL19 ligado a CCR7 internaliza o complexo receptor-ligante. No entanto, enquanto CCR7 é reciclado de volta para a superfície celular, CCL19 é separado para o lisossomo para degradação, exibindo o destino oposto para CCR7 endocitosado e seu ligante (Otero *et al.*, J Immunol 2006; 177:2314-2323). Para um ADC anti-CCR7 bem-sucedido é preferível que o anticorpo se comporte de forma semelhante ao ligante, por exemplo, que se internalize rapidamente, mas que não seja reciclado novamente para fora com CCR7. Para conseguir isso, certificamo-nos de selecionar anticorpos dependentes de ph, que exibiriam ligação mais fraca a CCR7 sob condições de pH baixo.

[00405] Para avaliar a dependência de pH dos anticorpos anti-CCR7, foi realizado um ELISA utilizando partículas tipo vírus que expressam CCR7 (VLP). Em suma, placas com 384 poços Maxisorp™ (Thermo Nunc) foram revestidas com 25 µg/ml de VLP. Anticorpos primários foram incubados em pH 5,8 (1:1; tampão citrato dH2O:0,1M, 150 mM de NaCl) ou tampão a pH 7,4. De outro modo, foram seguidas as instruções de protocolo genérico de ELISA, conforme descrito acima.

[00406] Entre um número de variantes de humanização para cada um dos candidatos, uma comparação de anticorpos que se ligam a pH neutro (7,4) e ácido (pH 5,8) mostrou que todos os anticorpos candidatos CCR7 têm afinidade melhorada a pH 7,4 (Tabela 13). As entidades

abaixo foram escolhidas com base na sua dependência superior de pH entre outras características.

Tabela 13: Dependência de pH de Anticorpos Anti-CCR7 Humanizados em relação a VLP que Expressam CCR7

	ELISA; Kd (nM)		
Anticorpo CysMab humanizado	Tampão a pH 7,4	Tampão a pH 5,8	Valores de alteração (pH 5,8/7,4)
121G12	0,1411	0,5207	4
506E15	0,0571	0,4942	9
674J13	0,0162	0,1657	10
684E12	0,0374	0,5041	13

Ensaio de β-Arrestina

[00407] Para determinar a funcionalidade dos anticorpos anti-CCR7, o ensaio de β-Arrestina foi realizado utilizando o PathHunter Flash Detection Kit da DiscoverX (#93-0247), quer em modo agonista para avaliação da função agonista, quer em modo antagonista para avaliação da função antagonista.

[00408] No modo agonista, células CHO-flpin-hCCR7 (linhagem celular feita por DiscoverX expressando hCCR7 marcado com ProLink, β-arrestina-EA) foram inoculadas em 8 x 10^4 células/poço em 20 µl/poço em meio de crescimento (meio F-12 de Ham/Glutamax; Invitrogen + 10% de SFB + 0,5 mg/ml de G418 + 0,2 mg/ml de higromicina B; Invitrogen + 5 µg/ml; Blasticidina; Gibco) com Dox 100 ng/ml em placas com 384 poços, cobertos com tampas de metal, incubados a 37°C, CO_2 a 5% durante a noite. No dia seguinte, uma diluição em série de uma solução de trabalho 5x em 1x de tampão de ensaio (HEPES a 20 mM/BSA a 0,1%/1x HBSS pH7,4) foi feita com anticorpos de teste ou controle positivo, usando o ligante hCCL19 (R&D, 361/MI-025/CF). 5 µl da solução de trabalho 5x de anticorpos ou ligante foram adicionados a cada poço, centrifugados brevemente e incubados a 37°C/ CO_2 a 5%, durante 2h. Após incubação, 25 µl de rea-

gente de detecção foram adicionados a cada poço, incubados à temperatura ambiente no escuro, agitando simultaneamente durante 20 minutos. Em seguida, o sinal de luminescência para a atividade enzimática foi medido na máquina Envision. Finalmente, a atividade enzimática foi analisada usando o Excel.

[00409] No modo antagonista, células CHO-flpin-hCCR7 foram inoculadas como descrito acima. No dia seguinte, uma solução de trabalho 6x (0,5 µM de x6 = 3,0 µM) em 1x de tampão de ensaio foi realizada para cada anticorpo de teste ou controle positivo MAB197 (anticorpo de referência R&D; antagonista ligante) ou controle negativo hIgG. 5 µl da solução de trabalho 6x de anticorpos ou controles foram adicionados a cada poço, centrifugados brevemente e incubados a 37°C/ CO_2 a 5% durante 30 minutos. Durante a incubação, diluições em série de uma solução de trabalho 6x em 1x de tampão de ensaio foram realizadas para hCCL19. Após incubação, 5 µl da solução de trabalho 6x de hCCL19 foram adicionados a cada poço, centrifugados brevemente e incubados a 37°C/ CO_2 a 5% durante 90 minutos. Após incubação, 25 µl de reagente de detecção foram adicionados a cada poço, incubados à temperatura ambiente no escuro, agitando simultaneamente durante 20 minutos. Em seguida, o sinal de luminescência para a atividade enzimática foi medido na máquina Envision e analisado em Excel.

[00410] Nenhum dos anticorpos anti-CCR7 parentais exibiu atividade no modelo agonista (Figura 4A). No entanto, quando executados em formato antagonista, 506E15 e 121G12 foram identificados como antagonistas fortes, por exemplo, anticorpos de bloqueio de ligante (Figuras 4B, 4C). 674J12 é um anticorpo de bloqueio neutro não-ligante. 684E12 é um antagonista fraco.

Ensaio de competição FACS com ligante

[00411] Para confirmar a competição de anticorpo com o ligante CCR7, o ensaio FACS foi realizado na presença de concentração de

ligante em excesso. O ensaio FACS foi realizado conforme descrito acima. Foram feitas algumas mudanças ao protocolo, por exemplo, CCL19 foi mantido a uma concentração constante de 1 μM, enquanto o anticorpo primário foi aplicado simultaneamente a células DEL variando entre diferentes logs, começando com um máximo de 100 nM. Após um tempo de incubação de 30 minutos em tampão FACS gelado, as células foram lavadas, anticorpo anti-hFc.PE secundário foi aplicado durante 15 min e a MFI foi determinada como descrito acima.

[00412] A Figura 5 mostra que CysMab.DAPA humanizado 674J13 não é impactado pela presença de CCL19 em excesso, confirmando a sua funcionalidade neutra. CysMab.DAPA humanizados 121G12 e 506E15 são, de fato, fortemente impactados na sua afinidade de ligação pela presença de ligante em excesso.

Capacidades de internalização em linhagens celulares com uma gama de densidades de receptor

[00413] Outro aspecto de um ADC anti-CCR7 bem-sucedido é garantir a utilização ideal da distribuição da expressão diferencial de CCR7. Como representante de células normais que expressam CCR7, as células T CD4+ foram isoladas a partir de PBMC de doadores saudáveis. Além disso, foram escolhidas várias linhagens celulares cancerígenas CCR7-positivas exibindo uma gama de densidades de receptor. Escolhemos propositadamente anticorpos com afinidades de ligação FACS aparentes mais fracas em células T CCR7+ do que em células cancerígenas CCR7+. Além disso, o ensaio pHrodo aqui descrito utiliza uma etiqueta de fluoróforo ativado por pH baixo nos anticorpos anti-CCR7 para avaliar se a absorção de anticorpos em células, como medida por fluorescência, se correlaciona com a densidade de receptor. É preferível minimizar a absorção de anticorpos em células normais para maximizar a janela terapêutica.

[00414] Resumidamente, a rotulagem dos anticorpos anti-CCR7 em

formato CysMab com maleimida-pHrodo (ThermoFisher) foi realizada seguindo as instruções do fabricante dando origem a entidades DAR=4 (fármaco, por exemplo, proporção de fluoróforo para anticorpo). O ensaio FACS foi realizado conforme descrito acima. Foram feitas algumas mudanças ao protocolo, por exemplo, para permitir a internalização, o anticorpo primário foi incubado a 5 µg/ml com células a 37°C em meio de cultura durante 6h e, em seguida, lavado com tampão FACS gelado contendo azida de sódio para parar a reação.

[00415] A Tabela 14 abaixo resume as capacidades de internalização de três anticorpos ao longo de um painel de linhagens celulares. Um anticorpo etiquetado com pHrodo não alvo foi utilizado como controle e foi descoberto que até 400 de MFI constitui ruído de fundo de sinal, por exemplo, absorção de anticorpo-conjugado mediada não alvo. Os dados mostram que todos os três anticorpos anti-CCR7, requerem níveis de receptor de CCR7 no intervalo que é típico para a maioria das linhagens cancerígenas CCR7+, por exemplo, acima de 20.000 receptores, para internalizar de forma eficiente e acumular matéria conjugada, poupando simultaneamente células T CD4+ normais.

Tabela 14: Capacidades de Internalização de Vários Anticorpos Anti-CCR7

Linhagem Celular	Números de receptor	pHrodo (6h MFI)		
		121G12.CysMab. Humanizado DAPA	506E15.CysMab. Humanizado DAPA	617J13.CysMab. Humanizado DAPA
Células T CD4+	2000	278	429	402
JVM3	8717	148	238	146
CMLT1	19583	301	465	561
Jeko-1	28852	450	908	1389
Mec2	50840	1340	3089	3004
L1236	61602	1237	3126	5824
MOTN1	84200	1026	2899	2539
DEL	110685	1913	3058	3777
MJ	111121	1649	3870	3259
KE97	152093	1567	2723	4416
L540	167549	6836	16117	11800

Pré-classificação de Epitopo usando o sistema Octeto Red96

[00416] Foi realizada a pré-classificação de epitopo de anticorpos parentais anti-hCCR7 utilizando o sistema Octet Red96 (ForteBio, E.U.A.), que mede a interferometria de biocamada (BLI). O molde de imunógeno CCR7 foi biotinilado através de um AviTag™ utilizando biotina ligase BirA de acordo com as recomendações do fabricante (Avidity, LLC, E.U.A. cat# BirA500). O molde de imunógeno biotinilado foi carregado a 1,5 µg/ml para sensores de estreptavidina pré-equilibrados (ForteBio, E.U.A.). Os sensores foram então transferidos para uma solução contendo 100 nM de anticorpo A em 1x tampão de cinética (ForteBio, E.U.A.). Os sensores foram lavados brevemente em 1x tampão de cinética e transferidos para uma segunda solução contendo 100 nM de anticorpo competidor. A cinética de ligação foi determinada a partir de dados em bruto usando o software de análise de sistema Octet Red96 (versão 6.3, ForteBio, E.U.A.). Os anticorpos foram testados em todas as combinações de duplas, tanto como Anticorpo A, como anticorpo competidor.

Tabela 15: Resultados de Pré-classificação de Anticorpos

Bin	Anticorpo
1	684E12; MAB197
2	674J13
3	506E15
4	121G12

Mapeamento de epitopos usando mutações CCR7

[00417] Foi realizado mapeamento adicional de epitopos usando linhagens celulares CCR7 mutantes. Foram geradas linhagens celulares NIH/3T3 que exprimem variantes mutantes de CCR7 humano. Mutações foram introduzidas em posições específicas para trocar o resíduo de CCR7 humano para o correspondente resíduo de CCR7 de murino. As mutações geradas incluíam D35E, F44Y, L47V, S49F, D198G,

R201K, S202N, S204G, Q206D, A207T, M208L, I213V, T214S, E215A e H216Q. Os construtos de plasmídeo CCR7 mutantes foram gerados por mutagênese dirigida ao local e introduzidos em células NIH/3T3 para produzir linhagens celulares de expressão estável. A ligação específica de anticorpos candidatos a cada linhagem celular CCR7 mutante foi avaliada por citometria de fluxo. As células foram lavadas com PBS e cuidadosamente tratadas com Accutase (Millipore #SCR005) para se elevarem de placas de crescimento e ressuspensas a aproximadamente $1*10^5$ células/90 µL em 1x tampão FACS (2% de FBS + 0,1% de NaN3 em PBS). Em uma placa de fundo em U com 96 poços, foram pré-inoculados 10 µL de 10x solução de anticorpo em tampão FACS e foram adicionados 90 µL de suspensão celular. As células foram incubadas durante 30 minutos a 4°C, lavadas 1x com PBS frio e ressuspensas em 100 µL de 1:500 de tampão 1x FACS de anticorpo secundário (IgG anti-humano de cabra F(ab')2 conjugado com aloficocianina, específico de Fcγ; Jackson, Immunoresearch Cat# 109-136-098). Após incubação adicional de 15 min a 4°C, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 100 µL de 1x tampão FACS + 4 µg/mL de iodeto de propídio (Life Technologies, Cat# P3566). A intensidade de fluorescência média geométrica foi calculada em células individuais vivas usando FlowJo e representada graficamente em % de intensidade de fluorescência média geométrica WT CCR7.

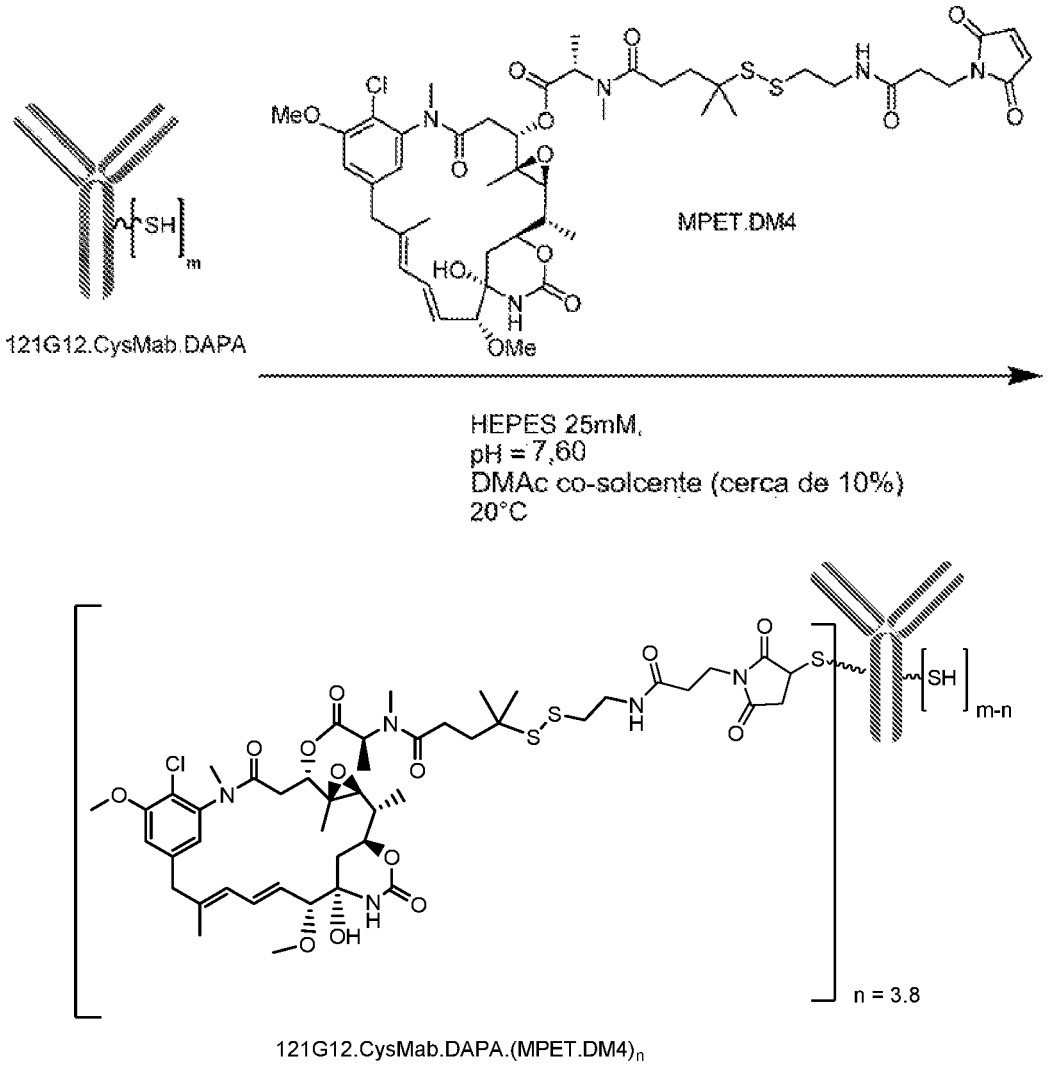
[00418] As afinidades com base em EC50 para CCR7 com ponto de mutação demonstram que todos os anticorpos testados têm diferentes perfis de ligação, o que implica uma utilização diferente de um epitopo conformacional (Figura 6). De todos os anticorpos mostrados, 506E15 tem o padrão de ligação mais semelhante a MAB197, por exemplo, ambos mostram uma queda significativa de afinidade de ligação quando os resíduos F44 ou L47 no terminal N de CCR7 são mutados, mas

não quando M208 ou I213 na alça EC2 são mutados. 121G12 e 674J13 parecem utilizar um conjunto diferente de pontos de contato fundamentais dentro do espaço de epitopo conformacional, uma vez que diferem de MAB197 em pelo menos 4 das 8 mutações de ponto testadas.

Exemplo 4: Geração e Caracterização de Conjugados de Fármaco e Anticorpo CCR7

Na seção a seguir, uL e µL são usados indistintamente para referir microlitros. Da mesma forma, uM e µM são usados indistintamente para referir micromolar; e um é usado para referir micrômetro.

[00419] Exemplo 4A: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4



121G12.CysMab.DAPA.(MPET.DM4)$_n$

[00420] Conjugação de 121G12.CysMab.DAPA e MPET.DM4 purificados:

[00421] O material de partida era anticorpo 121G12.CysMab.DAPA a 127 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 10 mM de tampão de cloridrato de histidina. A 7,9 ml de anticorpo (1003 mg) foram adicionados 16 ml de fosfato de sódio a 0,5 M a pH 8 (Teknova S1280), o pH foi verificado como >7 e, em seguida, anticorpo foi absorvido para 100,3 ml de resina de proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) durante 25 minutos, com agitação suave à temperatura ambiente. A resina, carregada a 10 mg de leito Ab/ml, foi lavada com 15 volumes de leito de 1x tampão PBS (Hyclone SH30256.02) por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo (Nalgene 567-0020) e, em seguida, ressuspensa em 100,3 ml de 1x PBS para dar origem a 50% de pasta fluida.

[00422] À pasta fluida foram adicionados 4329 ul de cisteína a 0,5 M (Sigma G121-03) formulada em fosfato a 0,5 M, pH 8, ao qual tinha sido adicionado NaOH (Alfa Aesar A16037) na proporção de 13,6 g/L. A pasta fluida foi ocasionalmente agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 100,3 ml de 1xPBS (50% de pasta fluida) e 1003 ul de 100 uM de $CuCl_2$ (Aldrich 751944) foram adicionados ($Cu2^+$ a 500 nM líquido) para dar início a reoxidação. A reoxidação do anticorpo foi testada removendo uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de uma maleimida de referência (Exemplo 3, página 110 de WO2015/095301), que é conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobre-

nadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para 0,1% de ácido trifluoroacético em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00423] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 60 minutos), 3010 ul de um estoque a 20 mM de MPET.DM4 em DMSO foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 30 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00424] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (201 ml) foi neutralizado com 20,1 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 60 ml utilizando concentradores spin (Amicon UFC905024) a 3.000 x g. O concentrado foi então aplicado a colunas de troca de tampão 24 x PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de concentrado e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante.

[00425] Para estudos de estabilidade, o material foi agrupado com

um lote preparado de forma idêntica para fornecer 2 gramas de material de base. O material agrupado foi dialisado extensivamente (balão Slidealyzer, Thermo Scientific 87762) contra 10 mM de tampão de cloreto de histidina a pH 5 (histidina da JTBaker 2080-05), concentrado para ~30 mg/ml e, em seguida, foram adicionados sacarose (Millipore 1,00892.1003) e Tween 20 (JTBaker 4116-04) a 240 mM e 0,02% (v/v), respectivamente. O material em excesso ao exigido para os estudos de estabilidade foi trocado de volta para 1xPBS. As amostras foram separadas em alíquotas e rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As concentrações finais foram de 23,9 mg/ml para o material formulado para testes de estabilidade e 18,9 mg/ml para o material formulado em 1xPBS.

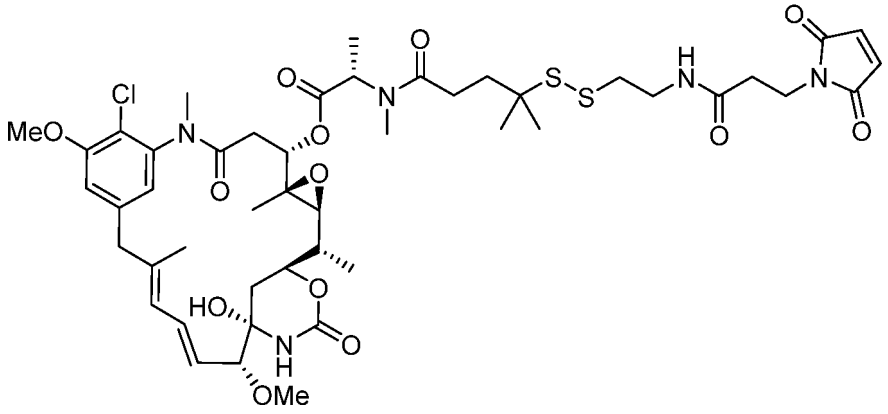
[00426] Os dados analíticos das amostras resultantes são os seguintes:

Parâmetro	Amostra de estabilidade	Amostra 1xPBS
Concentração (mg/ml)	23,9	18,9
Pirogênio (EU/ml)	0,1	0,05
% de agregado	<1	<1
DAR	3,79	3,79

[00427] **Métodos de análise:** A concentração foi determinada por OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG a 10 mg/ml. O pirogênio foi determinado usando um ensaio Kinetic QCL (Lonza Walkersville 50-650H) lido em um leitor de placas TECAN Safire. O agregado percentual foi determinado por cromatografia de exclusão de tamanho analítica em uma pré-coluna Shodex KW-G (Thomson Instrument Company Cat# 6960955) e coluna KW-803 (TIC Cat# 6960940) equilibrada com fase móvel [20mM de Tris ~pH7,65 (preparada com 10mM Tris pH7,4, 10mM de Tris, pH8), 200 mM de NaCl, 0,02% de azida de sódio], com aquisição de dados a 280 nm. Uma alíquota da amostra foi preparada para determinação DAR por diluição da amostra a 2 mg/ml em 1xPBS, deglicosando a amostra

com PNGaseF (interno) durante 10 minutos a 50 °C, removendo o PNGaseF por ligação à proteína A, lavagem com 1xPBS, e eluindo com 1% de ácido fórmico. A amostra foi então injetada em uma coluna PLRP-S 2,1x50 mm (partículas de 8 µm, tamanho de poro 1000Å), equilibrada para ácido fórmico a 0,1% em CH_3CN/água a 20% (Invitrogen) operando a 0,5 ml/min. A coluna foi lavada com CH_3CN/ água a 20% durante 3 minutos e, em seguida, eluída com um gradiente de 0,1 minuto para ácido fórmico a 0,1%, CH_3CN/ água a 90% que foi mantido durante 1,9 minutos. Os dados espectrais de massa foram colhidos em um instrumento Agilent 1260 e desconvoluídos com Análise Quantitativa Masshunter B.05.00 em um intervalo de 110 a 180 kDa. As áreas de pico correspondentes a vários estados DAR calculados foram ponderadas de acordo com o DAR de cada pico, e em seguida a área somada e ponderada do pico DAR4 foi dividida pela soma de todos os picos ponderados para obter o valor de DAR.

[00428] Preparação da carga útil de ligante MPET.DM4:



Métodos analíticos

[00429] A não ser que indicado de outro modo, os seguintes métodos de HPLC e HPLC/MS foram usados na preparação de Intermediários e Exemplos.

[00430] A análise de LC/MS foi realizada em um sistema Agilent 1200sl/6140.

Coluna: Waters Acquity HSS T3 C18, 50x2,0, 1,8 um

Fase Móvel: A) H_2O + 0,05% de TFA; B: acetonitrila + 0,035% de TFA

Método de bomba:

Tempo	% de A	% de B	Fluxo (ml/min)
0	90	10	0,9
1,35	0	100	0,9
1,36	0	100	0,9
1,95	0	100	0,9
1,96	90	10	0,9
2,0	90	10	0,9

Detecção: Arranjo de Diodos UV a 190 nm a 400 nm

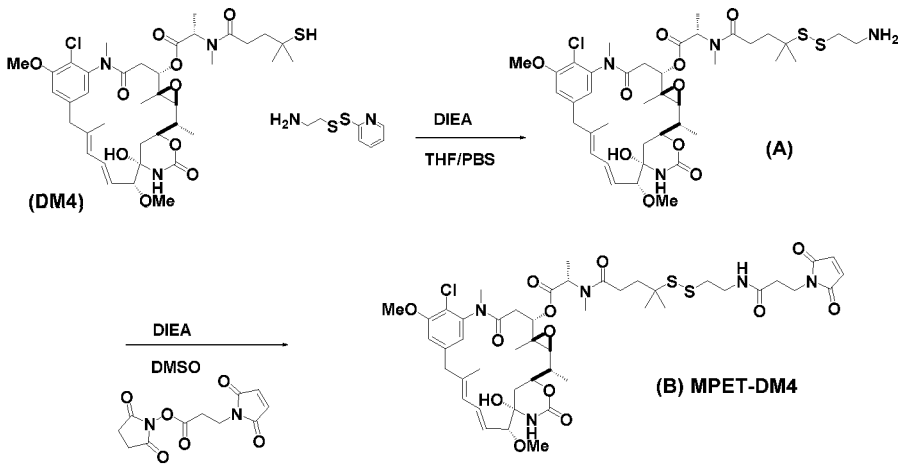
Varredura de MS: 200 a 1350 amu

ELSD: 60 °C

Parâmetros de MS:

Polaridade	Positivo
Gás de secagem	12
Pressão de nebulizador	50
Temperatura de gás de secagem	350
Tensão capilar	3000

[00431] N-(4-((2-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido) etil)dissulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato de (14S,16S,32S, 33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidróxi-85,14-dimetóxi-33,2,7, 10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-benzenaciclotetradecafano-10,12-dien-4-ila



[00432] Etapa 1: Preparação de N-(4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-me-

tilpentanoil)-N-metil-L-alaninato de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidróxi-85,14-dimetóxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-benzenaciclotetradecafano-10,12-dien-4-ila

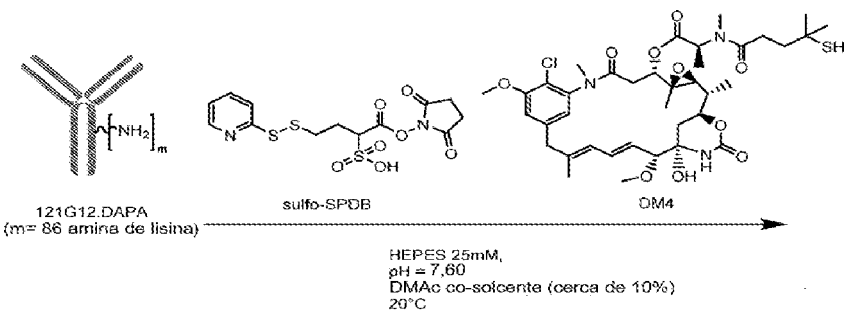
[00433] A DM4 (480 mg, 0,62 mmol) dissolvido em tampão PBS (10,5 ml) e THF anidro (21 ml) foram adicionados 2-(piridin-2-ildissulfanil)etan-1-amina (151 mg, 0,68 mmol) e DIEA (0,27 ml, 1,54 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos e concentrada em vácuo. O resíduo aquoso foi diluído com CH_3CN (1 ml) e H_2O (2 ml) e purificado por ISCO de fase reversa, eluído com 10 a 60% de acetonitrila-H_2O contendo 0,05% de TFA. As porções contendo o produto desejado foram liofilizadas para obter o produto desejado (555 mg, 93% de rendimento). ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD-d_4) δ ppm 0,83 (s, 3 H) 1,21 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,25 (s, 3 H) 1,28 (s, 3 H) 1,30 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,25 (s, 3 H) 1,28 (s, 3 H) 1,30 (d, *J*=5,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,37-2,43 (m, 1 H) 2,53-2,59 (m, 1 H) 2,64 (dd, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,82-2,89 (m, 5 H) 2,91 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,16 (dd, *J*=5,0 e 10,0 Hz, 2 H) 3,20 (s, 3 H) 3,23 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,16 (dd, *J*=5,0 Hz, 1 H) 3,58 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,16 (dd, *J*=5,0 e 10,0 Hz, 2 H) 3,20 (s, 3 H) 3,23 (d, *J*=5,0 Hz, 2 H) 5,66 (dd, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,82-2,89 (m, 5 H) 2,91 (d, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,82-2,89 (m, 5 H) 2,91 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,16 (dd,

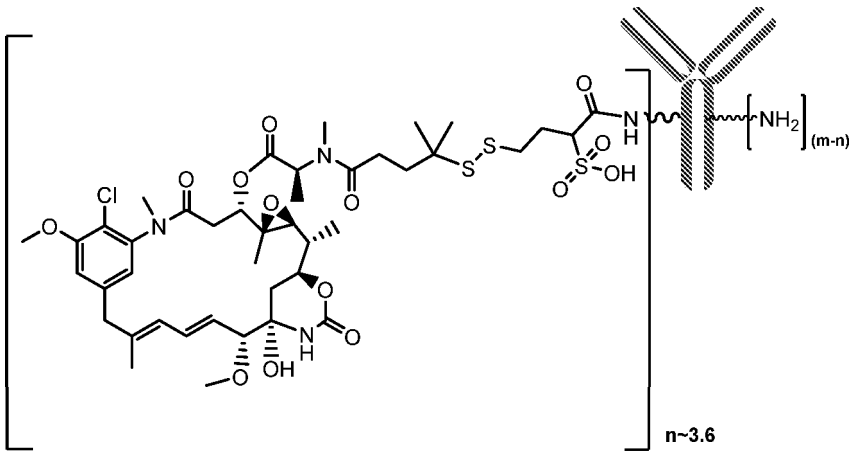
[00434] Etapa 2: Preparação de N-(4-((2-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etil)dissulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidróxi-85,14-dimetóxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-benzenaciclotetradecafano-10,12-dien-4-ila.

[00435] A N-(4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidróxi-85,14-dimetóxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxa-

zinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-benzenaciclotetradecafano-10,12-dien-4-ila (555 mg, 0,57 mmol) dissolvido em DMSO anidro (7 ml), foram adicionados 3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (171 mg, 0,63 mmol) e DIEA (249 ml, 1,43 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 15 min e neutralizada usando TFA. A mistura foi resfriada a 0 °C com banho gelado, seguido por adição de CH3CN (2 ml) e H2O (7 ml) e, então, purificada por ISCO de fase reversa e eluída com 10 a 70% de acetonitrila-H2O contendo 0,05% de TFA. As porções contendo o produto desejado foram liofilizadas para obter o produto desejado (430 mg, 66% de rendimento). ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0,81 (s, 3 H) 1,23 (s, 3 H) 1,24 (s, 3 H) 1,25 (s, 1 H) 1,28 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,31 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,43-1,49 (m, 1 H) 1,61 (d, *J*=15,0 Hz, 1 H) 1,64 (s, 3 H) 1,81-1,87 (m, 1 H) 1,94 - 2,01 (m, 1 H) 2,19 (dd, *J*=5,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,30-2,36 (m, 1 H) 2,54 (t, *J*=5,0 Hz, 2 H) 2,61 (dd, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H) 2,70 (t, *J*=5,0 Hz, 2 H) 2,88 (s, 3 H) 3,00 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,13 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,21 (s, 3 H) 3,55 (s, 3 H) 3,45 (q, *J*=5,0 Hz, 2 H) 3,49 (d, *J*=5,0 Hz, 1 H) 3,62 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,83 (t, *J*=5,0 Hz, 1 H) 3,98 (s, 3 H) 4,32 (m, 1 H) 4,80 (dd, *J*=5,0 e 10,0 Hz, 1 H) 5,28 (d, *J*=5,0 Hz, 1 H) 5,66 (dd, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H)) 6,22 (s l, 1 H) 6,42 (dd, *J*=10,0 e 15,0 Hz, 1 H) 6,50 (s, 1 H) 6,63 (s, 1 H) 6,66 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 6,70 (s, 2H) 6,83(s, 1H); MS m/z 988,3 (M+H-H_2O), Tempo de retenção 1,145 minuto.

<u>Exemplo 4B: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 121G12.DAPA.sSPDB.DM4</u>





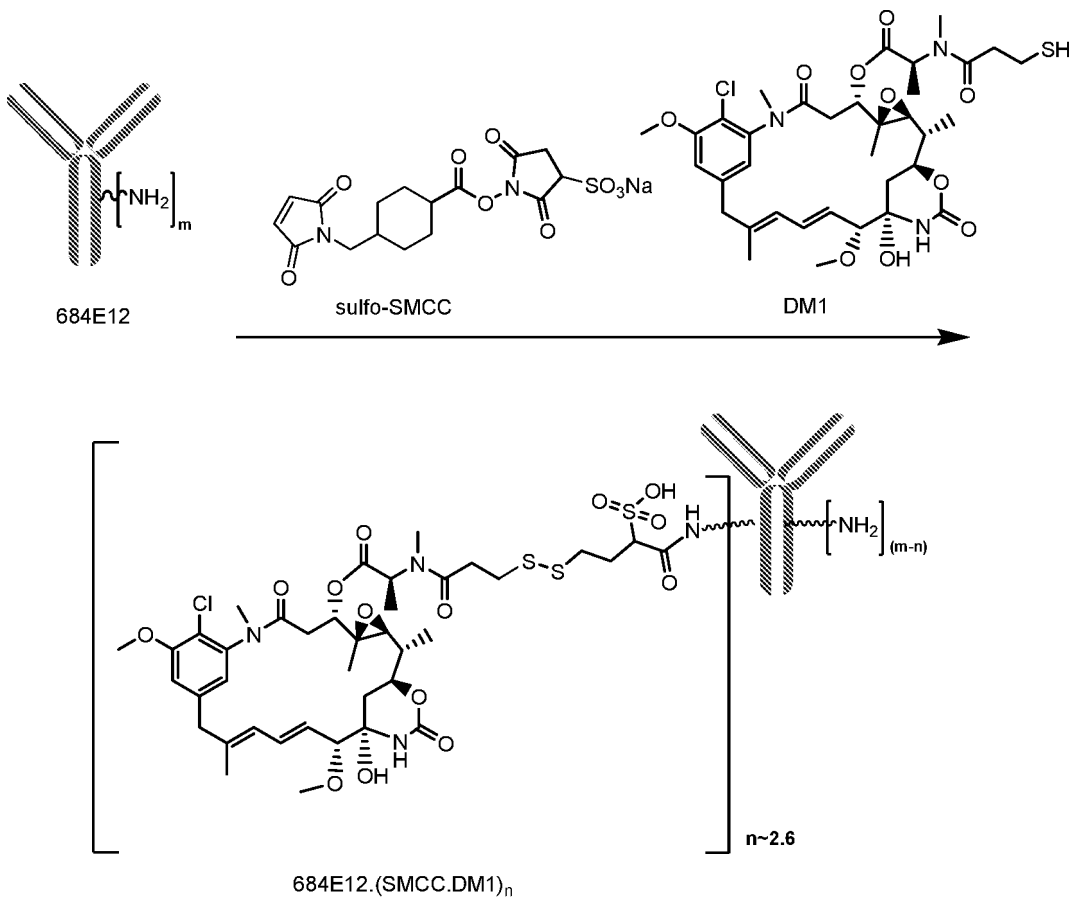
121G12.DAPA.(sSPDB.DM4)$_n$

[00436] A uma solução agitada de 25 mM de tampão HEPES a pH 7,6 (3 ml; esterilizado) e dimetilacetamida (DMAc; 0,12 ml) a 22°C, foi adicionada uma solução (1,695 ml) de 121G12.DAPA; MW~ 145546 g/mol; 62 mg (0,426 µmol) em tampão de fosfato de potássio (10 mM, pH6; esterilizado). Foi adicionado maitansinoide DM4 (2,42 mg) (3,101 µmol) dissolvido em 0,242 ml de DMAc. Foi adicionado ligante sulfoS-PDB (0,970 mg) (2,386 µmol, corrigido para ensaio) dissolvido em 0,970 ml de DMAc. Após 18 h, a mistura de reação foi analisada quanto a conclusão da reação por SEC-UV e HPLC.

[00437] A mistura de reação foi purificada a partir de subprodutos de molécula pequena e o tampão foi trocado por meio de filtração através de células de membrana Amicon; corte de 30 kDa usando tampão PBS a 10 mM-pH7,4 (esterilizado) para lavagem. O concentrado de Amicon obtido foi combinado e diluído para 10 mg/ml (UV) para produzir uma solução de 2,9 ml do conjugado de anticorpo e fármaco 121G12.DAPA.sSPDB-DM4 em tampão PBS a 10 mM-pH7,4 (49% de recuperação de proteína).

[00438] Por meio de SEC-UV, a razão entre fármaco e anticorpo foi determinada como sendo n = 3,6 e a pureza monomérica como sendo 98,7%. O nível de endotoxina foi de 0,14 EU/mg (teste BET Endosafe).

Exemplo 4C: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 684E12.SMCC.DM1



[00439] À solução de anticorpo (684E12 parental) (7,1 mg/mL, 3,4 mL, cerca de 47 µM, PBS, pH 7,4), foram adicionados 100 µL de DM1 a 2 mM (0,17 mg) em DMA e 50 µL de sulfo-SMCC a 4 mM (0,15 mg) em DMA e a mistura foi incubada e suavemente agitada a 4°C durante a noite. Após incubação, a mistura de reação foi purificada por meio de dessalinização em uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (GE Healthcare) utilizando PBS, pH 7,4, como tampão contínuo e esterilizada por filtração. O conjugado purificado foi analisado por MALDI-MS e a DAR estimada como sendo de 2,6. SEC analítica mostrou 3,7% de agregação (ou 96,3% de monômero) presente na amostra e teste LAL (PTS, Charles River Laboratories), determinou o valor de endotoxinas como sendo de 0,36 EU/mg.

Exemplo 4D: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 506E15.AURIX1

[00440] O material de partida era anticorpo 506E15.CysMab (WT Fc) a 18,8 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x salino tamponado com fosfato (1xPBS). 1,76 ml de anticorpo foram absorvidos para 3 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) e à pasta fluida resultante foram adicionados 240 ul de cisteína a 0,5 M (Sigma G121-03) formulada em fosfato a 0,5 M, pH 8, ao qual tinha sido adicionado NaOH (Alfa Aesar A16037) na proporção de 13,6 g/L. A pasta fluida foi ocasionalmente agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 2 ml de 1xPBS (50% de pasta fluida) e 60 ul de CuCl2 a 100 uM (Aldrich 751944) foram adicionados ($Cu2^+$ a 100 nM líquido) para dar início a reoxidação. Depois de 420 minutos, foram adicionados mais 90 ul de CuCl2 a 100 uM para acelerar ainda mais a reoxidação. A reoxidação do anticorpo foi testada através da remoção de uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de uma maleimida de referência: (Exemplo 3, página 110 de WO2015/095301), que é conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para ácido trifluoroacético a 0,1% em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore

TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00441] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 565 minutos), 220 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1 em DMSO foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 70 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00442] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (6 ml) foi neutralizado com 0,6 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 2,5 ml utilizando um concentrador *spin* (Amicon UFC905024) a 3.000 x g, aplicado a uma coluna de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibrada para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de concentrado e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 22 mg (66%).

Exemplo 4E: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 506E15.CysMab.DAPA.AURIX2

[00443] O material de partida era anticorpo 506E15.CysMab.DAPA a 10 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x de salino tamponado com fosfato (1xPBS). 2,0 ml de anticorpo foram absorvidos para 2 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) e à pasta fluida resultan-

te foram adicionados 160 ul de cisteína a 0,5 M (Sigma G121-03) formulada em fosfato a 0,5 M, pH 8, ao qual tinha sido adicionado NaOH (Alfa Aesar A16037) na proporção de 13,6 g/L. A pasta fluida foi ocasionalmente agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 2 ml de 1xPBS (50% de pasta fluida) e 10 ul de CuCl2 a 100 uM (Aldrich 751944) foram adicionados ($Cu2^+$ a 250 nM líquido) para dar início a reoxidação. A reoxidação do anticorpo foi testada removendo uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de uma maleimida de referência (Exemplo 3, página 110 de WO2015/095301), que é conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para ácido trifluoroacético 0,1% em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e os picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00444] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 295 minutos), 80 ul de um estoque a 20 mM de AURIX2 em DMSO

foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 85 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00445] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (4 ml) foi neutralizado com 0,4 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, aplicado a 2 x colunas de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de eluato e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 13,3 mg (67%).

Exemplo 4F: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 674J13.CysMab.AURIX1

[00446] O material de partida era anticorpo 674J13.CysMab (WT Fc) a 9 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x salino tamponado com fosfato (1xPBS). A 57,6 ml de anticorpo foi adicionado DTT até 200 mM (Invitrogen 15508-013) e a solução foi incubada durante 75 minutos, para reduzir fortemente o Ab. Os Abs reduzidos foram então aplicados a colunas de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de concentrado e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O eluato dos PD10s foi reunido e, em seguida, reaplicado a colunas PD10 frescas para remover mais completamente o DTT. De notar que em experimentos separados, as colunas PD10 são mais eficazes na remoção de DTT do que seria visto apenas através de mecanismo de exclusão por tamanho, desde que as colunas sejam utilizadas apenas uma vez.

[00447] A reoxidação do anticorpo foi testada pela remoção de uma

alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de estoque a 20 mM de AURIX1, conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14,000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para ácido trifluoroacético a 0,1% em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e os picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00448] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 180 minutos), 290 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1 em DMSO foram adicionados juntamente com 6 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I). A pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 40 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00449] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (11,5 ml) foi neutralizado com 1,2 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 2,5 ml utilizando um concentrador *spin* (Amicon UFC905024) a 3.000 x g, aplicado a uma coluna de troca de tampão

PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibrada para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de concentrado e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 26 mg (41%)

Exemplo 4G: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 674J13.CysMab.DAPA.AURIX2

[00450] O material de partida era anticorpo 674J13.CysMab.DAR4.DAPA a 31,7 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x de salino tamponado com fosfato (1xPBS). 9,5 ml de anticorpo foram absorvidos para 30,1 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) e à pasta fluida resultante foram adicionados 1800 mg de DTT (Invitrogen 15508-013), para reduzir fortemente o Ab (DTT a 200 mM líquido). A pasta fluida foi agitada à temperatura ambiente durante 20 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 2 ml de 1xPBS e agitada à temperatura ambiente - nenhum cobre foi adicionado (isto acelerava demasiado a reoxidação). A reoxidação do anticorpo foi testada removendo uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de uma maleimida de referência (Exemplo 3, página 110 de WO2015/095301), que é conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para ácido trifluoroacético a 0,1% em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick

and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e os picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00451] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 80 minutos), 903 ul de um estoque a 20 mM de AURIX2 em DMSO foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 50 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00452] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (60,2 ml) foi neutralizado com 6,0 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 17,5 ml utilizando um concentrador *spin* (Amicon UFC905024) a 3.000 x g, aplicado a 7 colunas de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de concentrado e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 243 mg (81%)

Exemplo 4H: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.DAPA.AURIX1

[00453] O material de partida era anticorpo 121G12.CysMab.DAPA a 16,7 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x de salino tamponado com fosfato (1xPBS). 3,6 ml de anticorpo foram absorvidos para 6 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) e a pasta fluida resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 125 minutos

e, em seguida, foram adicionados 544 ul de cisteína a 0,5M (Sigma G121-03) formulada em fosfato a 0,5 M, pH 8, ao qual tinha sido adicionado NaOH (Alfa Aesar A16037) na proporção de 13,6 g/L. A pasta fluida foi ocasionalmente agitada à temperatura ambiente durante 60 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 2 ml de 1xPBS (50% de pasta fluida) e 16 ul de CuCl2 a 100 uM (Aldrich 751944) foram adicionados ($Cu2^+$ a 250 nM líquido) para dar início a reoxidação. A reoxidação do anticorpo foi testada removendo uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1, conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80°C) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para 0,1% de ácido trifluoroacético em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e os picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00454] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 170 minutos), 67 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1 em DMSO foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suave-

mente à temperatura ambiente durante 120 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00455] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (15 ml) foi neutralizado com 1,5 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 5 ml utilizando um concentrador *spin* (Amicon UFC905024) a 3.000 x g, aplicado a 2 x colunas de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de eluato e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 54 mg (92%).

Exemplo 4I: Preparação de conjugado de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.AURIX1

[00456] O material de partida era anticorpo 121G12.CysMab (Fc WT) a 12,5 mg/ml (OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG de 10 mg/ml) em 1x de salino tamponado com fosfato (1xPBS). 4,8 ml de anticorpo foram absorvidos para 6 ml de resina de Proteína A RMP (GE Healthcare 1-223BPO/I) e a pasta fluida resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 125 minutos e, em seguida, foram adicionados 592 ul de cisteína a 0,5 M (Sigma G121-03) formulada em fosfato a 0,5 M, pH 8, ao qual tinha sido adicionado NaOH (Alfa Aesar A16037) na proporção de 13,6 g/L. A pasta fluida foi ocasionalmente agitada à temperatura ambiente durante 60 minutos e, em seguida, lavada por filtração a vácuo através de uma unidade de filtro de 0,2 um em forma de gargalo com 50 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição. A resina lavada foi ressuspensa em 2 ml de 1xPBS (50% de pasta fluida) e 16 ul de CuCl2 a 100 uM (Aldrich 751944) foram adicionados ($Cu2^+$ a 250

nM líquido) para dar início a reoxidação. A reoxidação do anticorpo foi testada removendo uma alíquota de 30 ul de pasta fluida, adicionando 1 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1, conhecida por mudar o pico de anticorpo por RPLC, misturando durante 1 minuto, girando a 7.000 xg durante 10 segundos, removendo o sobrenadante, adicionando 60 ul de tampão de eluição de IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), girando a 14.000 xg durante 10 segundos, recolhendo amostras de sobrenadante e analisando produtos por RPLC do seguinte modo: 2 ul de amostra foram injetados em uma coluna PLRP-S Agilent aquecida (80ºC) 4.6x50 mm (partículas de 5 µm, 4000Å de tamanho de poros) equilibrada para ácido trifluoroacético a 0,1% em 29,5% de CH_3CN/ água (Millipore TX1280P-1, Burdick and Jackson 407-4) funcionando a 1,5 ml/min. A coluna foi eluída com gradiente de 5 minutos para 44,5% de CH_3CN/ água, que foi mantido por 1,9 minutos e foram detectados picos a 280 nm. O tempo ideal para conjugação é definido como o tempo em que o pico de produto principal é máximo, os picos eluídos posteriormente estão minimizados e os picos eluídos anteriormente ainda não estão a aumentar.

[00457] Quando ensaio RPLC indicou reoxidação ideal (neste caso, 160 minutos), 67 ul de um estoque a 20 mM de AURIX1 em DMSO foram adicionados e a pasta fluida foi ocasionalmente agitada suavemente à temperatura ambiente durante 120 minutos. A pasta fluida foi, em seguida, lavada com 20 volumes de leito de 1xPBS em pelo menos 10 ciclos de filtração e adição.

[00458] A pasta fluida foi então transferida para uma coluna fritada (Pierce 7375021), pré-eluída com 0,5 volumes de leito de tampão de eluição de IgG Thermo (descartado) e, em seguida, eluída com 2 volumes de leito do mesmo tampão. Todo o eluato (15 ml) foi neutralizado com 1,5 ml de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8, em seguida, concentrado para 5 ml utilizando um concentrador *spin* (Amicon UFC905024)

a 3.000 x g, aplicado a 2 x colunas de troca de tampão PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas para 1xPBS, carregando com 2,5 ml de eluato e eluindo com 3,5 ml de 1xPBS de acordo com o fabricante. O rendimento foi de 52 mg (89%).

[00459] **Métodos de análise:** A concentração foi determinada por OD280 com um coeficiente de extinção de 13,7 para uma solução de IgG a 10 mg/ml. O pirogênio foi determinado usando um ensaio Kinetic QCL (Lonza Walkersville 50-650H) lido em um leitor de placas TECAN Safire. O agregado percentual foi determinado por cromatografia de exclusão de tamanho analítica em uma pré-coluna Shodex KW-G (Thomson Instrument Company Cat# 6960955) e coluna KW-803 (TIC Cat# 6960940) equilibrada com fase móvel [20mM de Tris ~pH7,65 (preparada com Tris a 10mM, pH7,4, Tris a 10mM, pH8), NaCl a 200 mM, azida de sódio a 0,02%], com aquisição de dados a 280 nm. Uma alíquota da amostra foi preparada para determinação de DAR por diluição da amostra a 2 mg/ml em 1xPBS, desglicosando a amostra com PNGaseF (interno) durante 10 minutos a 50 °C, removendo o PNGaseF por ligação à proteína A, lavando com 1xPBS e eluindo com ácido fórmico a 1%. A amostra foi reduzida por adição de ¼ de volume de acetato de amônio a 5M, pH 5,0, contendo TCEP a 0,5 M e incubando à temperatura ambiente durante 30 minutos. A amostra foi então injetada em uma coluna PLRP-S 2,1x50 mm (partículas de 8 µm, tamanho de poro 1000Å), equilibrada para ácido fórmico a 0,1% em CH_3CN/água a 20% (Invitrogen) operando a 0,5 ml/min. A coluna foi lavada com CH_3CN/ água a 20% durante 3 minutos e, em seguida, eluída com um gradiente de 0,1 minuto para ácido fórmico a 0,1%, CH_3CN/ água a 90% que foi mantido durante 1,9 minutos. Os dados espectrais de massa foram colhidos em um instrumento Agilent 1260 e desconvoluídos com Análise Quantitativa Masshunter B.05.00 em um intervalo de 15 a 60 kDa. As áreas de pico correspondentes a vários

estados DAR calculados foram ponderadas de acordo com o DAR de cada pico, em seguida a área somada e ponderada do pico DAR4 foi dividida pela soma de todos os picos ponderados para obter o valor de DAR.

[00460] Os dados analíticos da amostra resultante são os seguintes:

Parâmetro	506E15.DAPA. AURIX2	506E15. AURIX1	674J13.DAPA. AURIX2
Concentração (mg/ml)	1,9	6,7	9
Pirogênio (EU/ml)	0,05	0,42	0,05
% de agregado	<1	<1	2,8
DAR	3,80	3,78	HC 3,93 LC 0,03

-continuação-

Parâmetro	674J13. AURIX1	121G12. AURIX1	121G12.DAPA AURIX1
Concentração (mg/ml)	8,4	7,5	7,8
Pirogênio (EU/ml)	<0,5	0,05	0,05
% de agregado	<1	1,2	1,9
DAR	HC 3,8	3,80	3,80

Exemplo 4J: Preparação de Conjugados Adicionais Utilizando Outros Anticorpos CysMab

[00461] Os métodos descritos no Exemplo 4A também são utilizados para produzir conjugados MPET.DM4 com outros anticorpos manipulados com cisteína.

[00462] Os métodos são utilizados para produzir conjugados Ab.CysMab.MPET.DM4 anti-P-caderina utilizando anticorpos NOV169N31Q(E152C-S375C), NEG0012(E152C-S375C), NEG0013 (E152C-S375C), NEG0016(E152C-S375C), NEG0064(E152C-S375C), NEG0067(E152C-S375C), NOV169N31Q(K360C(HC)-K107C(LC)), NEG0012(K360C(HC)-K107C(LC)), NEG0013(K360C(HC)-K107C (LC)), NEG0016(K360C(HC)-K107C(LC)), NEG0064(K360C(HC)-K107C(LC)) e NEG0067(K360C(HC)-K107C(LC)) divulgados na Publicação PCT Nº WO2016/203432.

Exemplo 5: Caracterização de ADC *in vitro*

[00463] Os conjugados de anticorpo e fármaco (ADC) foram caracterizados por vários métodos analíticos e funcionais. Os ADC mantiveram ligação a proteína CCR7 alvo em células tal como avaliado por FACS. Para todos os ADC, a intensidade de fluorescência média geométrica no ensaio de ligação FACS estava dentro de 20% do valor para o anticorpo não conjugado. SEC analítica revelou que os ADC tinham > 95% do material com o peso molecular desejado; nos casos onde isto não foi observado para os produtos de reação iniciais, a utilização de SEC preparativa alcançou a especificação necessária. A razão entre fármaco e anticorpo (DAR) foi avaliada por LCMS da amostra de anticorpo reduzida desglicosilada, somando as abundâncias de várias espécies DAR e ponderando o número de moléculas de fármaco em cada uma das espécies DAR (por exemplo, um íon DAR2 simples conta como 2, um íon DAR1 simples conta como 1). Os conjugados compreendendo regiões constantes que contêm duas mutações de cisteína eram, pelo menos, iguais ou superiores a DAR 3,4 e, mais geralmente, iguais ou superiores a DAR 3,8. Isto foi consistente em todos os conjugados relatados.

Exemplo 6: Ensaio de Inibição de Proliferação Celular/Viabilidade Celular

[00464] Acima, mostram que as versões conjugadas com fluoróforos de todos os três anticorpos anti-CCR7 podem internalizar CCR7 e eficazmente acumular o fluoróforo conjugado nos departamentos de células de baixo pH ao longo de um painel de linhagens celulares. Aqui, mostramos a capacidade do anticorpo internalizar e acumular matéria conjugada intracelularmente em um ambiente onde a matéria conjugada é uma carga tóxica.

[00465] Em um ambiente de ADC (pgADC) *piggyback*, efeitos citotóxicos de anticorpos anti-CCR7 complexados com um fragmento de anticorpo secundário conjugado com carga útil foram estudados por

avaliação da viabilidade celular após quatro dias de tratamento. Três diluições das IgGs específicas de CCR7 foram preparadas e misturadas com uma quantidade constante de fragmento Fab acoplado a carga útil. A concentração final de fragmento Fab acoplado a carga útil foi de 0,5 µg/ml. O reagente Fab é um Fab dirigido a anti-Fc de camundongo conjugado quer para MMAF quer para Saporina (Advanced Targeting Systems, Fab-Zap). Após pré-incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, 10 µl/poço do complexo anticorpo-carga útil foram adicionados a placas brancas de fundo com 384 poços em triplicados. As células (CCR7+) respectivas foram inoculadas de modo a que a sua densidade fosse menor do que 1 x 10^6/ml para células em suspensão e foi alcançada 80% de confluência para as células aderentes. As células foram colhidas (as células aderentes foram destacadas com Accutase) e ressuspensas para aproximadamente 2 x 10^4 células/mL. As células foram adicionadas a placas de 384 poços na parte superior do complexo anticorpo-carga útil (20 µl/poço). A placa foi incubada durante quatro dias a 37 °C e CO_2 a 5%. Subsequentemente, 20 µl/ poço de solução CellTiter-Glo (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay; Promega, #G7571) foram preparados e adicionados às células. Apenas as células viáveis produzem ATP, que é necessário para a reação de luciferase (fornecida pela CellTiter-Glo) resultando em luminescência. De acordo com isto, a viabilidade celular foi determinada pelo sinal de luminescência, que foi medido após 10 minutos de incubação a 22 °C e 400 rpm com o leitor Multilabel Envision 2104. Os valores IC50 foram calculados usando o software GraphPad Prism.

[00466] A Figura 7A e a Figura 7B mostram que todos os quatro anticorpos anti-CCR7 são capazes de morte celular dependente de concentração de células CCR7+ KE97 células no formato de ensaio *piggyback* utilizando o reagente conjugado com MMAF. A tabela abaixo resume os resultados de experimentos utilizando MMAF ou Sapori-

na como cargas úteis de ferramenta *piggyback*.

Tabela 16: IC50 e AMAX de anticorpos anti-CCR7 em ensaio citotóxico pgADC

	Anti-mFc.MMAF		Fab-ZAP	
	IC50 (nM)	AMAX (%)	IC50 (nM)	AMAX (%)
121G12 Parental	0,055	104	0,064	43
506E15 Parental	0,070	95	0,135	60
674J13 Parental	0,137	102	6,12	31
684E12 Parental	0,214	80	2,60	33
MAB197 (R&D)	0,142	85	0,155	40

[00467] A especificidade de morte pgADC foi avaliada utilizando linhagens celulares negativas alvo. Um exemplo é mostrado na Figura 8, utilizando o reagente FabZap. O aumento específico dependente de CCR7 em atividade pgADC 121G12 é observado em células KE97 e NIH3T3.hCCR7 em contraste com as células parentais NIH-3T3 CCR7 negativas ou anticorpo de controle mIgG.

Exemplo 7: Impacto de Anticorpos Anti-CCR7 de Camundongo com Reatividade Cruzada Conjugados com AURIX1 ou não Conjugados em Células Hematopoiéticas Normais de Camundongo *In Vivo*

[00468] A expressão de tecido normal entre espécies está restrita a células de origem hematopoiética, incluindo células T CD4+ e CD8+ no sangue e órgãos linfoides, apresentando uma responsabilidade de segurança potencial para ADC visando CCR7, especialmente em um formato de Fc de tipo selvagem que pode levar a ADCC e depleção de célula linfoide.

[00469] Para determinar o impacto de visar CCR7 com um ADC em células hematopoéticas normais *in vivo*, foi avaliado Ab parental 121G12 com reatividade cruzada de camundongo, conjugado ou não conjugado com AURIX1, em camundongos fêmea CD-1 saudáveis com 6 a 8 semanas de idade, em formato Fc de tipo selvagem ou si-

lenciado (DAPA). Os camundongos receberam um único tratamento IV de 121G12 parental.Cys-Mab.tipo selvagem Fc.hIgG1 (121G12.wt.Fc), 121G12 parental.Cys-Mab.DAPA.hIgG1 (121G12.DAPA.Fc), 121G12 parental.Cys-Mab.tipo selvagem Fc.hIgG1.AURIX1 (121G12.wt.Fc. AURIX1) ou 121G12.parental.Cys-Mab.DAPA.hIgG1.AURIX1 (121G12. DAPA.Fc.AURIX1), a uma dose final de 10 mg/kg. Todas as doses foram ajustadas para os pesos corporais individuais dos camundongos.

[00470] No dia 25 pós-tratamento, os baços foram extraídos e dissociados em suspensões de células individuais utilizando gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec Inc., San Diego, CA). 1 milhão de células por cada amostra foram então coradas com um cocktail de Abs que incluiu anticorpo CD8a de rato anticamundongo BUV737, clone 53-6.7 (1:100) (BD Biosciences, San Jose, CA, Cat # 564297) e CD4 de rato anticamundongo BV510, clone RM4-5 (1:200) (BD Biosciences, San Jose, CA, Cat#563106) para determinar o impacto dos tratamentos individuais em células T CD4+ e CD8a+. Foram incubadas amostras a 4 °C durante 30 min, lavadas em salino tamponado com fosfato HyClone gelado (Hyclone Laboratories, Logan, Utah) e avaliadas no analisador de células BD LSRFortessaTM (BD Biosciences, San Jose, CA). Contagens celulares de esplenócitos totais foram usadas para determinar a depleção de células T CD4+ ou CD8a+. Foi utilizado o teste T para determinar a significância entre grupos.

[00471] Como mostrado na Tabela 17 e na Figura 9, foi observada uma forte redução de células T CD4+ (FC 0,5-0,6) e CD8a+ (FC 0,3-0,5) no baço no Dia 3 do tratamento com Abs 121G12.wt.FC ou 121G12.wt.Fc.AURIX1 a 10 mg/kg, sugerindo que o impacto de depleção de células T foi independente da presença da carga útil de AURIX1. Estes efeitos foram resgatados por silenciamento dE Fc através da introdução de mutações DAPA. Tanto 121G12.DAPA.Fc como 121G12.DAPA.Fc.AURIX1 não conseguiram impactar as populações

de células T em relação ao grupo Sem Tratamento. Estes dados indicam que os ADC anti-CCR7 podem ter uma responsabilidade de segurança de depleção de células T que pode ser resgatada através de silenciamento DAPA do Fc.

Tabela 17: Impacto de Anticorpo 121G12 em populações de células T CD4+ e CD8a+ em camundongos CD-1

	Células T CD8+				
	Sem Tratamento	121G12-wtFc	121G12.DAPA.Fc	121G12.wt.Fc.AURIX1	121G12.DAPA.Fc.AURIX1
Média	5833	3041	6003	2013	5317
SE	650	629	860	426	526
Valores de Alteração		0.5	1.0	0.3	0.9
Valor p		<0.05	NS	<0.001	NS

	Células T CD4+				
	Sem Tratamento	121G12-wtFc	121G12.DAPA.Fc	121G12.wt.Fc.AURIX1	121G12.DAPA.Fc.AURIX1
Média	20896	12512	18547	10324	19633
SE	480	2326	2004	1602	1520
Valores de Alteração		0.6	0.9	0.5	0.9
Valor p		<0.05	NS	<0.001	NS

[00472] O experimento foi avaliado no Dia 25 de tratamento. Valores de alteração (FC) = Contagens Médias de Esplenócitos no Dia 25 para o Grupo de Tratamento indicado / Contagens Médias de Esplenócitos para Grupo de Controle Sem Tratamento no Dia 3. Foi utilizado o teste T para determinar a significância versus grupo Sem Tratamento (*p <0,05, *** p <0,001; NS = não significativo).

Exemplo 8: Atividade ADC Anti-CCR7 de Conjugados Diretos

[00473] Os efeitos citotóxicos após a ligação de anticorpos diretamente conjugados (ADC) com várias cargas úteis e a sua internalização em células CCR7(+) foram estudados por avaliação da viabilidade celular após quatro dias de tratamento. Três diluições dos ADC foram adicionadas a placas brancas de fundo com 384 poços em triplicado (10 µl/ml). As respectivas células (CCR7+) foram inoculadas de modo a que a sua densidade fosse menor do que 1 x 10^6/ml para células em

suspensão e foi alcançada 80% de confluência para as células aderentes. As células foram colhidas (as células aderentes foram destacadas com Accutase) e ressuspensas para aproximadamente 2 x 10^4 células/mL. As células foram adicionadas a placas de 384 poços na parte superior do anticorpo (20 µl/poço). As placas foram incubadas durante quatro dias a 37 °C e CO_2 a 5%. Subsequentemente, 20 µl/ poço de solução de CellTiter-Glo (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay; Promega, #G7571) foram preparados e adicionados às células. A viabilidade celular foi determinada pelo sinal de luminescência, que foi medido após 10 minutos de incubação a 22 °C e 400 rpm com o leitor Envision. Os valores IC50 foram calculados usando o software GraphPad Prism.

[00474] A tabela abaixo mostra exemplos de efeitos de viabilidade celular medidos com anticorpos CysMab anti-CCR7 em formato Fc de tipo selvagem ou silenciado (DAPA) conjugado com AURIX1 ou AURIX2.

Tabela 18: IC50 de ADCs Anti-CCR7 em Ensaio Citotóxico

		Atividade ADC em ensaio de viabilidade celular; IC50 (nM)			
Linhagem celular	Tipo de câncer	506E15.CysMab.AURIX1	674J13.CysMab. AURIX1	506E15.CysMab.DAPA. AURIX2	674J13.CysMab.DAPA.AURIX2
DEL	ALCL	0,0029	0,0741	0,0084	0,1167
KE97	Mieloma múltiplo	0,0031	0,03	0,0131	0,0658

[00475] Para avaliar os ADC quanto a especificidade para o alvo e a dependência ao nível do receptor, foi testada a atividade ADC em linhagens celulares com diferentes níveis de receptor de CCR7. A tabela abaixo mostra um exemplo para o anticorpo 674J13 humanizado no formato CysMab.DAPA e conjugado com AURIX2. As linhagens celulares foram escolhidas com base em sensibilidade semelhante à carga útil.

Tabela 19: IC50 de anticorpo 674J13 humanizado em formato DAPA e conjugado com AURIX2

			Atividade ADC em ensaio de viabilidade celular; IC50 (nM)
Linhagem celular	Tipo de câncer	Níveis de receptor de CCR7	674J13.CysMab.DAPA.AURIX2
DEL	ALCL	~100,000	0,2417 (>95% AMAX)
KE97	Mieloma Múltiplo	~100,000	0,1018 (>95% AMAX)
SR786	Linfoma anaplásico de células T grandes	~28,000	2,737 (90% AMAX)
CML-T1	Leucemia de Células T	~29,000	3,779 (60% AMAX)
DND-41	Leucemia de Células T	1,700	< 20% AMAX
NCI-H82	Câncer de pulmão de células pequenas	0	Sem extermínio

[00476] Como se pode ver no experimento pHrodo, a atividade de ADC exige um maior grau de números de receptores do que a modalidade ADCC. O corte exato de receptor depende de vários parâmetros (por exemplo, avidez do anticorpo, potência de carga útil), mas os dados apresentados aqui descrevem o conceito geral. Utilizar um anticorpo anti-CCR7 dependente de avidez em formato DAPA influencia a atividade de ADC em relação a células cancerígenas acima de PBMC de CCR7+ normais, que são aqui representadas por linhagens celulares de câncer com menos de 2.000 receptores CCR7.

Exemplo 9: Introdução de um ADC MPET.DM4 Específico ao Local

[00477] ADCs conjugados com DM4 estão bem estabelecidos no campo dos ADC. Aqui é descrita a geração e uso de um MPET.DM4 conjugado especificamente ao alvo usando a versão CysMab dos anticorpos, o que tem a vantagem de produzir um lote ADC controlado por DAR reprodutível de forma homogênea, onde s DAR (razão entre fármaco e anticorpo) é de cerca de 4. Conjugados não específicos ao local foram descritos como contendo muitas vezes populações significativas com elevada DAR, o que tem sido associado a características

biofísicas desfavoráveis, incluindo hidrofobicidade aumentada e, consequentemente, eliminação mais rápida, perfil PK pobre e um aumento de toxicidade. Abaixo apresentamos várias avaliações *in vitro* e *in vivo* de um ADC anti-CCR7 com base em MPET.DM4 em comparação com o seu homólogo sSPDB.DM4.

Exemplo 10: Afinidade de ligação FACS de ADCs MPET.DM4 versus sSPDB.DM4

[00478] Outra melhoria potencial de conjugação específica ao local em relação a conjugação não específica ao local poderia ser uma potencial interferência de locais de conjugação de Lisina que estão estruturalmente nas proximidades de resíduos CSD essenciais. Pode ser esperado que a conjugação de carga útil para tais locais de Lisina tenha um impacto sobre a afinidade de ligação do ADC. Para testar as afinidades de ligação de ADC usando os aqui descritos MPET.DM4 conjugado com CysMab versus sSPDB.DM4 conjugado com Lisina endógeno, a afinidade de ligação foi determinada por FACS como descrito acima. A tabela abaixo resume alguns dados de afinidade representativos, que mostram uma ligeira diminuição na afinidade de ligação do ADC sSPDB.DM4 versus o ADC MPET.DM4.

Tabela 20: Afinidade de ligação de ADCs anti-CCR7

		Afinidade de ADC em FACS; EC50 (nM)		
Linhagem celular	Níveis de receptor de CCR7	121G12.CysMab.DAR4 não conjugado	121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR 3.8)	121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9)
DEL	≥100.000	5,24	5,61	8,42

Exemplo 11: Atividade *in vitro* de ADC MPET.DM4 versus sSPDB.DM4

[00479] Os efeitos citotóxicos dos ADC 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 e 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9) foram avaliados em um ensaio de viabilidade *in vitro*, tal como descrito acima. A tabela abaixo mostra atividade semelhante ligeiramente melhorada do conjugado MPET.DM4 em comparação com sSPDB.DM4,. Esta pode ser a

consequência de afinidade melhor conservada ou outros fatores.

Tabela 21: Atividade citotóxica *in vitro* de ADC anti-CCR7

	Atividade ADC em ensaio de viabilidade celular; IC50 (nM)	
Linhagem celular	121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9)
L540	2,944	3,905
DEL	2,286	2,983
KE97	2,171	3,177

[00480] O ADC 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 foi ainda testado em uma variedade de linhagens celulares de câncer que cobrem vários cenários de indicações, alcançando morte celular substancial que se correlaciona com as densidades de receptor.

Tabela 22: Atividade citotóxica *in vitro* de ADC Anti-CCR7 em Linhagens Celulares

Linhagem celular	Tipo de câncer	Densidade de receptor relativa (%)	121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 IC50 (nM)
SUPHD1	Linfoma de Hodgkin	310	1,69
L540	Linfoma de Hodgkin	175	4,90
KE97	Mieloma Múltiplo	100	2,24
JVM2	MCL	79	4,62
MOTN1	CLL	67	4,24
DEL	ALCL	67	2,28
OCI-Ly3	ABC-DLBCL	43	6,42
Toledo	DLBCL	20	n.d.
Mec-2	CLL	15	>20
PEER	T-ALL	2	>20

Exemplo 12: Eficácia *In Vivo* Dependente da Dose de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 e 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 Contra Modelo de Xenoenxerto de Mieloma Múltiplo KE97 em Camundongos SCID bege

[00481] Para demonstrar a atividade antitumoral dirigida de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 e 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 *in vivo*, o modelo de xenoenxerto KE97 foi estabelecido em camundongos fê-

mea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 135 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 8 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a uma dose final de 0,5, 2 ou 5 mg/kg, 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR 3,9) a 0,5, 2 ou 5 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. Todas as doses foram ajustadas para os pesos corporais individuais dos camundongos.

[00482] Todos os agentes de teste foram tolerados no estudo e não foram observados sintomas clínicos evidentes de toxicidade ou perda de peso corporal em qualquer dos grupos de tratamento (Tabela 23).

Tabela 23: Eficácia de resposta à dose de ADC anti-CCR7 em modelo de xenoenxerto KE97

		Resposta Tumoral		Resposta do Hospedeiro	
Tratamento	Dose, calendário	ΔT/ΔC (%)	Regressão (%)	Δ peso corporal (%)	Sobrevivência (vivo/total)
Sem tratamento	Nenhuma	100	-	2,09	8/8
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Dose única	92,94	-	3,02	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	0,5 mg/kg Dose única	78,62	-	1,05	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg Dose única	-	33,07*	2,74	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Dose única	-	53,66*	0,46	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	0,5 mg/kg Dose única	85,38	-	1,84	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	2 mg/kg Dose única	13,77*	-	0,59	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	5 mg/kg Dose única	-	32,63*	3,63	8/8

[00483] O experimento foi avaliado no Dia 9 de tratamento (Dia 23 pós-implante), * p <0,001 versus grupo de controle Sem Tratamento (ANOVA de uma via / Teste de Comparações Múltiplas de Tukey). % ΔT/ΔC = 100 ΔT/ΔC onde: ΔT = volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia 23 (D23) de estudo - volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia inicial da dosagem; ΔC = volume tumoral médio do grupo de controle no dia 23 (D23) de estudo - volume tumoral médio do grupo de controle no dia inicial de dosagem D14. % de regressão = (1- T final/T inicial) x 100, em que T final significa volume tumoral médio e T inicial é definido como o volume tumoral no D14 de pós-implante. Δ peso corporal (%) = (peso corporal médio D23- peso corporal médio D14) *100 / Peso médio no D14 de tratamento.

[00484] Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o controle de isotipo não específico IgG1.CysMab. DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. O tratamento com 121G12.CysMab. DAPA.MPET.DM4 resultou em uma eficácia antitumoral dependente de dose, com valor ΔT/ΔC de 78,62% (0,5 mg/kg), ao passo que doses de 2 e 5 mg/kg resultaram em regressão de 33% e 54%, respectivamente, no dia 9 após a primeira dose (D23 pós-implante). O tratamento com 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 também demonstrou uma eficácia antitumoral dependente de dose com valores ΔT/ΔC de 85,38% (0,5 mg/kg) e 13,77% (2 mg/kg), enquanto que a dose de 5 mg/kg resultou em regressão média de 33%, no dia 9 após a primeira dose (D23 pós-implante). Nos dias 23 a 25 após o implante, os grupos de controle e grupos de tratamento com 0,5 mg/kg foram sacrificados e os grupos restantes receberam uma segunda dose no dia 28 após o implante de 121G12.CysMab. DAPA.MPET.DM4 a 2 ou 5 mg/kg ou 121G12.DAPA. sSPDB.DM4 a 2 ou 5 mg/kg. Foi observada regressão tumoral sustentada com 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 e 5 mg/kg, bem como com 121G12. DAPA.sSPDB.DM4 a 5 mg/kg até ao fim do estudo no dia 42 após o implante. A 2 mg/kg com 121G12.DAPA.sSPDB. DM4, a resposta foi

mais heterogênea, com aproximadamente 25% dos camundongos exibindo regressão tumoral sustentada, enquanto o resto do grupo mostrava doença estável ou progressão do tumor (Figura 10, Tabela 23).

Exemplo 13: Avaliação da eficácia de 121G12.CysMab.DAPA. MPET. DM4 vs 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 no Modelo de Mieloma Múltiplo KE97 a Maiores Volumes Tumorais Iniciais

[00485] Foi criado um modelo *in vivo* de barra superior usando a linhagem celular de mieloma múltiplo KE97 para diferenciar ainda mais a eficácia antitumoral dos diferentes ligantes cliváveis que comparam a eficácia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 121G12.DAPA. sSPDB. DM4 (DAR3.9) em tumores com maiores volumes tumorais iniciais na primeira dose. O modelo de xenoenxerto KE97 foi estabelecido em camundongos fêmea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 450 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em dois grupos de tratamento (n= 8). Os camundongos receberam um tratamento IV de 2 mg/kg de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 ou 121G12.DAPA.sSPDB.DM4.

[00486] Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 a 2 mg/kg. O tratamento com 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 resultou na regressão parcial/ estase prolongada em 75% (6 de 8) dos camundongos com uma única dose de tratamento (Figura 11). 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 teve um desempenho muito superior a 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 neste modelo (D25, Volume Tumoral Médio 524,83 ± 143,20 vs 1337,13 ± 35,13 respectivamente, $p < 0,001$; teste T não emparelhado).

Exemplo 14: Eficácia *In Vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra Modelo Tumoral de Câncer do Pulmão de Células Não Pequenas Primário HLUX1934 Derivado de Paciente

[00487] A atividade antitumoral de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.

DM4 foi avaliada no modelo de xenoenxerto de câncer do pulmão de células não pequenas primário HLUX1934 expressando CCR7. Camundongos nus atímicos fêmea foram implantados subcutaneamente com fragmentos de tumor no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 100 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 8). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a 10 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg. Uma segunda dose de cada anticorpo foi administrada 2 semanas mais tarde. Todas as doses foram ajustadas para os pesos corporais individuais dos camundongos.

[00488] Controle de isotipo não específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg pareceu atrasar ligeiramente o crescimento do tumor em relação ao grupo Sem Tratamento (valor $\Delta T/\Delta C$ 53,07%) potencialmente devido a ligação não específica do anticorpo fora do alvo no modelo HLUX1934. O tratamento com 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 resultou em eficácia mais pronunciada que foi mantida com a administração da segunda dose. A dose de 10 mg/kg de tratamento 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 foi bem tolerada sem perda aparente de peso corporal e com valor $\Delta T/\Delta C$ de 18,83% no dia 34 após o implante. (Figura 12, Tabela 24).

Tabela 24: Eficácia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 no modelo HLUX1934 derivado de paciente NSCLC. O experimento foi avaliado no dia 34 após o implante (D23 após o tratamento).

		Resposta Tumoral	Resposta do Hospedeiro	
Tratamento	Dose	$\Delta T/\Delta C$ (%)	Δ peso corporal (%)	Sobrevivência (vivo/total)
Sem tratamento	Nenhuma	100	5,12	5/8**
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	10 mg/kg	53,07	2,81	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	10 mg/kg	18,83*	0,61	8/8

* P <0,001 versus grupo de controle Sem Tratamento (ANOVA de uma via/ Teste de Comparações Múltiplas de Tukey). % ΔT/ΔC = 100 ΔT/ΔC onde: ΔT = volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia 23 (D34) de estudo - volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia inicial da dosagem; ΔC = volume tumoral médio do grupo de controle no dia 23 (D34) de estudo - volume tumoral médio do grupo de controle no dia inicial de dosagem. Δ peso corporal (%) = (peso corporal médio D34-peso corporal médio D11) *100 / Peso médio no D11 de tratamento. ** Camundongos sacrificados no grupo Sem Tratamento devido a carga tumoral excessiva nos dias 25 a 27 após o tratamento.

Exemplo 15: Eficácia *In Vivo* de 684E12.SMCC.DM1 Contra Modelo de Xenoenxerto de Mieloma Múltiplo KE97 em Camundongos SCID bege

[00489] Para demonstrar a atividade antitumoral dirigida de 684E12.SMCC.DM1 *in vivo*, o modelo de xenoenxerto KE97 foi estabelecido em camundongos fêmea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 200 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 8 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 684E12.SMCC.DM1 parental (DAR2.6) a uma dose final de 2 ou 6 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico IgG1.SMCC.DM1 a 6 mg/kg. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos.

[00490] Todos os agentes de teste foram tolerados no estudo e não foram observados sintomas clínicos evidentes de toxicidade ou perda de peso corporal em qualquer dos grupos de tratamento. Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o controle de isotipo não específico IgG1.SMCC.DM1 ou 684E12.SMCC.

DM1 parental a 2 mg/kg. Tratamento com 684E12.SMCC.DM1 parental a 6 mg/kg resultou em valor ΔT/ΔC de 6,72% no dia 11 após a dose (p <0,0001, ANOVA de uma via / Teste de Comparações Múltiplas de Tukey) (Figura 13).

Exemplo 16: Modulação *In Vivo* de Marcador Farmacodinâmica no Alvo por 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 no Modelo de Tumor KE97

[00491] Acumulação das células tumorais positivas de marcador H3 de fosfo-histona após o tratamento com 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 foi usada para avaliar a capacidade de ADC anti-CCR7 induzir detenção de G2/M *in vivo*.

[00492] Foi realizado um estudo onde o modelo de xenoenxerto KE97 foi estabelecido em camundongos fêmea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 140 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 3 por grupo). Os camundongos receberam um único tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a uma dose final de 2, 5 ou 10 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos. 48 horas após o tratamento, foram recolhidos tumores para avaliação dos níveis de fosfo-histona H3 por coloração imuno-histoquímica descrita abaixo.

[00493] Para medir a acumulação de núcleos positivos fosfo-histona H3 por imuno-histoquímica, um anticorpo policlonal de coelho visando resíduos rodeando Serina 10 fosforilada de histona H3 humana foi obtido da Ventana Medical Systems (Tuscon, AZ, Cat #760-4591). O protocolo IHC incluiu calor e exposição leve (32 min) a reagente de recuperação de antígeno Ventana Discovery Cell Conditioner 1. As amostras foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo primário (pré-diluído pelo fabricante). Posteriormente, foi

realizada incubação com Ab OmniMap secundário HRP anticoelho Ab (Ventana, Tuscon, AZ, Cat#760-4311) durante 12 minutos (pré-diluído pelo fabricante).

[00494] Na Figura 14A, embora o Sem Tratamento e controle de isotipo IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 representativos mostrem eventuais células tumorais positivas quanto a fosfo-histona H3, é detectado um robusto aumento dependente de dose em imunocoloração com fosfo-histona H3 48 horas após a administração de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4. A quantificação do sinal foi realizada usando MatLab (MathWorks Natick, MA), onde a área total de sinal de fosfo-histona H3 (μm^2) foi normalizada pela área total de núcleos (μm^2), gerando os valores de proporção de fosfo-histona H3 (%) indicados abaixo para cada um dos grupos de tratamento. Estes dados da Figura 14B indicam que 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 é capaz de suscitar uma forte detenção de G2/M nos xenoenxertos tumorais, consistente com o mecanismo de ação esperado da carga útil.

Exemplo 17: Processo para a produção de Anticorpo 121G12.CysMab. DAPA

[00495] Este exemplo descreve um processo para a produção de anticorpo CCR7 121G12.CysMab.DAPA de uma cultura celular, onde o Ab é expresso a partir de um vetor que codifica o Ab. Depois de o Ab ser expresso na cultura celular, o Ab é purificado a partir da cultura celular do seguinte modo:

[00496] A primeira etapa no processo de purificação do intermediário de substância de anticorpo e fármaco 121G12.CysMab.DAPA consiste na remoção de células por filtração de profundidade em linha, seguida por uma filtração de 0,2 µm.

[00497] A segundo etapa consiste em uma etapa de cromatografia líquida de afinidade de Proteína A. Dependendo da quantidade total do produto bruto, esta etapa é realizada em vários ciclos. Cada ciclo per-

mite uma carga máxima de aproximadamente 20 g/L de volume da coluna. A eluição é realizada com ácido acético a 50 mM em pH de aproximadamente 3,0. A temperatura de operação é de 18 a 28°C. Todos os eluatos são agrupados e armazenados entre 2 a 8°C antes da etapa de inativação do vírus.

[00498] A etapa três é uma inativação de vírus com "tratamento com pH baixo". A solução intermediária da etapa 2 é ajustada para 18 a 28°C e um ajuste do pH para 3,5 (intervalo de 3,4 a 3,6). A solução de produto intermediária é então mantida para inativação de vírus durante 70 minutos (intervalo de 60 a 90 minutos). Após o tempo de espera, a solução é ajustada para pH 6,0 (intervalo de 5,8 a 6,2). No final da etapa, a solução é filtrada em profundidade em linha com uma filtração de 0,2 µm e armazenada a uma temperatura entre 2 a 8°C.

[00499] A quarta etapa é uma cromatografia de troca catiônica em modo ligar/eluir que inclui uma redução integrada na coluna. Dependendo da titulação, esta etapa é realizada em vários ciclos. Cada ciclo permite uma carga de aproximadamente 30 g/L de volume da coluna. A coluna é equilibrada com tampão A contendo succinato de sódio a 20 mM, pH 6,0. É realizada redução na coluna com fosfato de sódio a 20 mM, EDTA a 1 mM, L-cisteína a 7 mM, pH 7,1 como tampão de redução. O tampão de redução é removido com tampão A e a eluição é realizada com um gradiente linear de 10% a 90% com tampão A e tampão B, contendo succinato de sódio a 10 mM, cloreto de sódio a 300 mM, pH 6,0. Eluatos e agrupamentos podem ser armazenados entre 2 a 8°C antes da etapa de cromatografia de troca aniônica multimodal.

[00500] A quinto etapa do processo é uma cromatografia de troca aniônica em modo de fluxo contínuo. Dependendo da titulação, esta etapa é realizada em vários ciclos. Cada ciclo permite uma carga máxima de aproximadamente 350 g/L de volume da coluna. A temperatura de operação é de 18 a 28°C. O equilíbrio é realizado com succinato

de sódio a 20 mM, cloreto de sódio a 119 mM, pH 6,0. O percolado final é armazenado a uma temperatura entre 2 a 8°C antes da etapa de remoção de vírus.

[00501] A filtração de vírus, etapa 6, consiste em uma pré-filtração com um filtro de 0,1 µm, seguido de uma filtração de vírus com um nanofiltro Planova 20N. A temperatura da solução intermediária da Etapa 5 é regulada para entre 18 a 28°C antes da filtração de vírus. A temperatura de operação é de 18 a 28°C. Após a nanofiltração, o produto intermédio é armazenado entre 2 a 8°C ou 18 a 28°C.

[00502] A sétima etapa, Ultrafiltração/Diafiltração, consiste em uma etapa de concentração para cima até aproximadamente 70 g/L, seguida de uma etapa de primeira diafiltração com fosfato de potássio a 10 mM, pH 6,0. É visado um fator de troca de diafiltração de, pelo menos, 7, seguido de uma diluição para aproximadamente 50 g/L. O produto intermédio de substância de fármaco final é filtrado a 0,2 µm e armazenado a uma temperatura entre 2 a 8°C.

[00503] Na oitava e última etapa, o produto intermédio de substância de fármaco bruto final é colocado em alíquotas em recipientes adequados e armazenado a uma temperatura inferior a -60°C após a congelação.

Tabela 25 Diagrama de fluxo do processo de purificação e redução

Etapa	**Operação**
Etapa 1	Colheita, remoção de células e filtração
Etapa 2	Cromatografia de Afinidade (MabSelect SuRE)
Etapa 3	Inativação de vírus a pH 3,5
Etapa 4	Cromatografia de Troca Catiônica e Redução na coluna (Fractogel EMD SO3 (M))
Etapa 5	Cromatografia de Troca Aniônica Multimodal(Capto adhere)
Etapa 6	Remoção de vírus por nanofiltração (Planova 20N)
Etapa 7	Ultrafiltração/Diafiltração e filtração final
Etapa 8	Enchimento e ultracongelação

Exemplo 18: Eficácia *in vivo* dependente da dose de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra modelo de xenoenxerto ABC-DLBCL OCI-LY3 em camundongos NSG.

[00504] Para demonstrar a atividade antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* em um modelo ABC-DLBCL, o modelo de xenoenxerto OCI-LY3 foi estabelecido em camundongos fêmea NSG por injeção subcutânea de células $10x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 140 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 6 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a uma dose final de 0,5 ou 2 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg no dia 1 e dia 15 do estudo. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos. Todos os agentes de teste foram tolerados no estudo e não foram observados sintomas clínicos evidentes de toxicidade ou perda de peso corporal em qualquer dos grupos de tratamento (Tabela 26).

[00505] Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o controle de isotipo não específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg. O tratamento com 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 resultou em eficácia antitumoral dependente da dose com valor $\Delta T/\Delta C$ de 74,6% (0,5 mg/kg) e 10,7% (1 mg/kg), enquanto que a dose de 2 mg/kg conduziu a regressão média de 65,9%, no dia 28 do estudo. 3 de 6 camundongos em 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg exibiram regressão completa (Figura 15).

Tabela 26: Eficácia de resposta à dose de ADC anti-CCR7 em modelo de xenoenxerto OCI-LY3 no Dia 28 do tratamento.

		Resposta Tumoral	
Tratamento	**Dose, calendário**	**ΔT/ΔC (%)**	**Regressão (%)**
Sem tratamento	Nenhuma	100,0	-
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg Doses D1 e D15	119,7	-
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	0,5 mg/kg Doses D1 e D15	74,6	-
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	1 mg/kg Doses D1 e D15	10,7**	
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg Doses D1 e D15	-	65,9**

Tabela 26: -continuação-

	Resposta do Hospedeiro	
Tratamento	**Δ peso corporal (%)**	**Sobrevivência (vivo/total)**
Sem tratamento	5,6	6/6
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	1,8	5/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	3,5	5/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2,9	6/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	-0,8	6/6

[00506] O experimento foi avaliado no Dia 28 de tratamento ** p <0,005 versus grupo de controle Sem Tratamento (ANOVA de uma via / Teste de Comparações Múltiplas de Tukey). % ΔT/ΔC = 100 ΔT/ΔC onde: ΔT = volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia 23 (D28) de estudo - volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia inicial da dosagem; ΔC = volume tumoral médio do grupo de controle no dia 23 (D28) de estudo - volume tumoral médio

do grupo de controle no dia inicial de dosagem D1. % de regressão =(1- $T_{final}/T_{inicial}$) x 100 foi calculado se $\Delta T<0$, em que T_{final} significa volume tumoral médio no D28 e $T_{inicial}$ é definido como o volume tumoral no D1 de tratamento. Δ peso corporal (%) = (peso corporal médio D28-peso corporal médio D1) *100 / Peso médio no D1 de tratamento.

Exemplo 19: Eficácia *in vivo* dependente da dose de 121G12.CysMab. DAPA.MPET.DM4 contra modelo de xenoenxerto GCB-DLBCL Toledo em camundongos SCID bege.

[00507] Para demonstrar a atividade antitumoral dirigida de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* em um modelo GCB-DLBCL, o modelo de xenoenxerto Toledo foi estabelecido em camundongos fêmea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 100 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 4 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA. MPET.DM4 (DAR4) a uma dose final de 2 ou 5 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg no dia 1 e dia 15 do estudo. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos. Todos os agentes de teste foram tolerados no estudo e não foram observados sintomas clínicos evidentes de toxicidade ou perda de peso corporal em qualquer dos grupos de tratamento (Tabela 27).

[00508] Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o controle de isotipo não específico hIgG1.CysMab. DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. Tratamento com 121G12.CysMab. DAPA.MPET.DM4 resultou em eficácia antitumoral dependente da dose, com valor $\Delta T/\Delta C$ de 52,7% (2 mg/kg) e 20,6% (5 mg/kg) (Figura 16, Tabela 27).

Tabela 27: Eficácia de resposta à dose de ADC anti-CCR7 em modelo de xenoenxerto Toledo no Dia 20 do tratamento.

		Resposta Tumoral
Tratamento	**Dose, calendário**	**ΔT/ΔC (%)**
Sem tratamento	Nenhuma	100,0
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Doses D1 e D15	94,5
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg Doses D1 e D15	52,7*
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Doses D1 e D15	20,6 **

Tabela 27: -continuação-

	Resposta do Hospedeiro	
Tratamento	**Δ peso corporal (%)**	**Sobrevivência (vivo/total)**
Sem tratamento	4,9	3/6
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	1,0	3/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	3,2	4/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	0,1	4/6

[00509] O experimento foi avaliado no Dia 20, * $p<0,05$, ** $p<0,005$ versus grupo de controle Sem Tratamento (ANOVA de uma via / Teste de Comparações Múltiplas de Tukey). % ΔT/ΔC = 100 ΔT/ΔC onde: ΔT = volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia 23 (D20) de estudo - volume tumoral médio do grupo tratado com fármaco no dia inicial da dosagem; ΔC = volume tumoral médio do grupo de controle no dia 23 (D20) de estudo - volume tumoral médio do grupo de controle no dia inicial de dosagem D1. Δ peso corporal (%) = (peso corporal médio D20-peso corporal médio D1) *100 / Peso médio no D1 de tratamento.

Exemplo 20: Eficácia *in vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra modelo de xenoenxerto ALCL DEL em camundongos SCID bege.

[00510] Para demonstrar a atividade antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* em um modelo ALCL CCR7 positivo, o modelo de xenoenxerto DEL foi estabelecido em camundongos fêmea SCID bege por injeção subcutânea de células $3x10^6$ no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 100 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 4 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a uma dose final de 2 mg/kg, ou um controle de isotipo não específico isotipo.MPET.DM4 a 2 mg/kg no dia 1 e dia 15 do estudo. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos.

[00511] Não foi observada eficácia antitumoral significativa após o tratamento com o controle de isotipo não específico hIgG1.CysMab. DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg. O tratamento com 121G12.CysMab. DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg resultou em regressão média de 40,2% ao dia 14 do estudo após uma dose única ($p<0,01$). Os camundongos receberam uma segunda dose no dia 15 e foram acompanhados por mais três semanas. Um animal com valores atípicos não respondeu a uma segunda dose de tratamento e teve de ser sacrificado no dia 28 devido a carga tumoral. Um outro animal revelou progressão lenta da doença e também foi abatido no dia 28 para seguimento de expressão de alvo. Dois dos quatro camundongos continuaram a apresentar um impacto sustentado no crescimento do tumor (Figura 17). Todos os tratamentos foram bem tolerados, sem aparente perda de peso corporal.

Exemplo 21: Eficácia *In Vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra Modelo Tumoral de Câncer do Pulmão de Células Não Pequenas Primário HLUX1787 Derivado de Paciente

[00512] A atividade antitumoral de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 foi avaliada no modelo de xenoenxerto de câncer do pulmão de células não pequenas primário HLUX1787 expressando CCR7. Camundongos NSG fêmea foram implantados subcutaneamente com fragmentos de tumor no flanco direito de cada camundongo. Quando os tumores atingiram cerca de 150 mm^3, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume do tumor em grupos de tratamento (n= 6 por grupo). Os camundongos receberam um tratamento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a 0,5, 2 ou 5 mg/kg no dia 1 e uma segunda dose foi administrada 2 semanas depois, no dia 15. Todas as doses foram ajustadas aos pesos corporais individuais dos camundongos.

[00513] Não foi observada eficácia antitumoral significativa com as doses menores do Ab conjugado, no entanto regressões parciais ou doença estável foram observadas com tratamento de 121G12. CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. Foi observada eficácia tumoral duas semanas após a segunda dose, resultando em valor $\Delta T/\Delta C$ de 1,3% no D30 de tratamento ($p<0,001$; ANOVA de uma via / Teste de Comparações Múltiplas de Tukey) (Figura 18). Todos os tratamentos foram bem tolerados, sem aparente perda de peso corporal.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga à proteína CCR7 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem função efetora reduzida ou não significativa em comparação com um anticorpo de tipo selvagem do mesmo isotipo.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem um nível reduzido ou não significativo de atividade de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC).

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma região Fc silenciada.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma mutação na região Fc selecionada entre: D265A; P329A; P329G; N297A; D265A e P329A; D265A e N297A; L234 e L235A; P329A, L234A e L235A; e P329G, L234A e L235A.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno não tem atividade significativa de extermínio de células.

6. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga com maior afinidade a células expressando níveis mais elevados de CCR7 do que a células expressando níveis inferiores de CCR7.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga com maior afinidade a células cancerígenas que expres-

sam níveis mais elevados de CCR7 do que a células normais que expressam um nível inferior de CCR7.

8. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno não elimina significativamente células hematopoiéticas normais que expressam CCR7.

9. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 1) de SEQ ID NO:1, uma HCDR2 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 2) de SEQ ID NO:2, e uma HCDR3 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Pesada 3) de SEQ ID NO:3; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 1) de SEQ ID NO:17, uma LCDR2 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 2) de SEQ ID NO:18, e uma LCDR3 (Região Determinante de Complementaridade de Cadeia Leve 3) de SEQ ID NO:19;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:4, uma HCDR2 de SEQ ID NO:5, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:6; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:20, uma LCDR2 de SEQ ID NO:21 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:22;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:7, uma HCDR2 de SEQ ID NO:8, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:9; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:23, uma LCDR2 de SEQ ID NO:24 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:25;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:10, uma HCDR2 de SEQ ID NO:11, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:12; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:26, uma LCDR2 de SEQ ID NO:27 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:28;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:33, uma HCDR2 de SEQ ID NO:34, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:35; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:49, uma LCDR2 de SEQ ID NO:50 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:51;

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:36, uma HCDR2 de SEQ ID NO:37, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:38; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:52, uma LCDR2 de SEQ ID NO:53 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:54;

g. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:39, uma HCDR2 de SEQ ID NO:40, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:41; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:55, uma LCDR2 de SEQ ID NO:56 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:57;

h. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:42, uma HCDR2 de SEQ ID NO:43, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:44; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:58, uma LCDR2 de SEQ ID NO:59 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:60;

i. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:65, uma HCDR2 de SEQ ID NO:66, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:67; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:81, uma LCDR2 de SEQ ID NO:82 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:83;

j. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:68, uma HCDR2 de SEQ ID NO:69, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:70; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:84, uma LCDR2 de SEQ ID NO:85 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:86;

k. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:71, uma HCDR2 de SEQ ID NO:72, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:73; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:87, uma LCDR2 de SEQ ID NO:88 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:89;

l. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:74, uma HCDR2 de SEQ ID NO:75, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:76; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:90, uma LCDR2 de SEQ ID NO:91 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:92;

m. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:596, uma HCDR2 de SEQ ID NO:597, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:598; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:612, uma LCDR2 de SEQ ID NO:613 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:614;

n. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:599, uma HCDR2 de SEQ ID NO:600, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:601; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:615, uma LCDR2 de SEQ ID NO:616 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:617;

o. uma região variável de cadeia pesada que compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO:602, uma HCDR2 de SEQ ID NO:603, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:604; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:618, uma LCDR2 de SEQ ID NO:619 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:620; ou

p. uma região variável de cadeia pesada que compreende

uma HCDR1 de SEQ ID NO:605, uma HCDR2 de SEQ ID NO:606, e uma HCDR3 de SEQ ID NO:607; e uma região variável de cadeia leve que compreende uma LCDR1 de SEQ ID NO:621, uma LCDR2 de SEQ ID NO:622 e uma LCDR3 de SEQ ID NO:623.

10. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:29;

b. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:45, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:61;

c. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:77, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93; ou

d. uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:608, e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:624.

11. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CCR7, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31;

b. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63;

c. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95; ou

d. uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:610, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:626.

12. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma ou mais substituições de cisteína.

13. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma ou mais substituições de cisteína selecionadas a partir de S152C, S375C ou ambas S152C e S375C da cadeia pesada do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU.

14. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

15. Conjugado de anticorpo e fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende a fórmula

$$Ab—(L—(D)_m)_n$$

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável; em que

Ab é um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antígeno de como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14;

L é um ligante;

D é uma porção de fármaco;

m é um número inteiro de 1 a 8; e

n é um número inteiro de 1 a 12.

16. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a

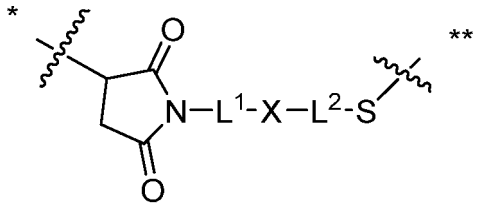
reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o referido m é 1.

17. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o referido n é cerca de 3 a cerca de 4.

18. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de que o referido ligante é selecionado a partir do grupo consistindo em um ligante clivável, um ligante não clivável, um ligante hidrofílico, um ligante procarregado e um ligante à base de ácido dicarboxílico.

19. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o ligante é derivado de um reagente de reticulação selecionado a partir do grupo consistindo em N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidila (SPP), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidila (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), iodoacetato de N-succinimidila (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, 4-(maleimidometil) ciclo-hexanocarboxilato de N-succinimidila (SMCC), 4-(maleimidometil) ciclo-hexanocarboxilato de N-sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC) e 17-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetra-aza-heptadecan-1-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (CX1-1).

20. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido ligante tem a seguinte Fórmula (IIA):



(IIA);

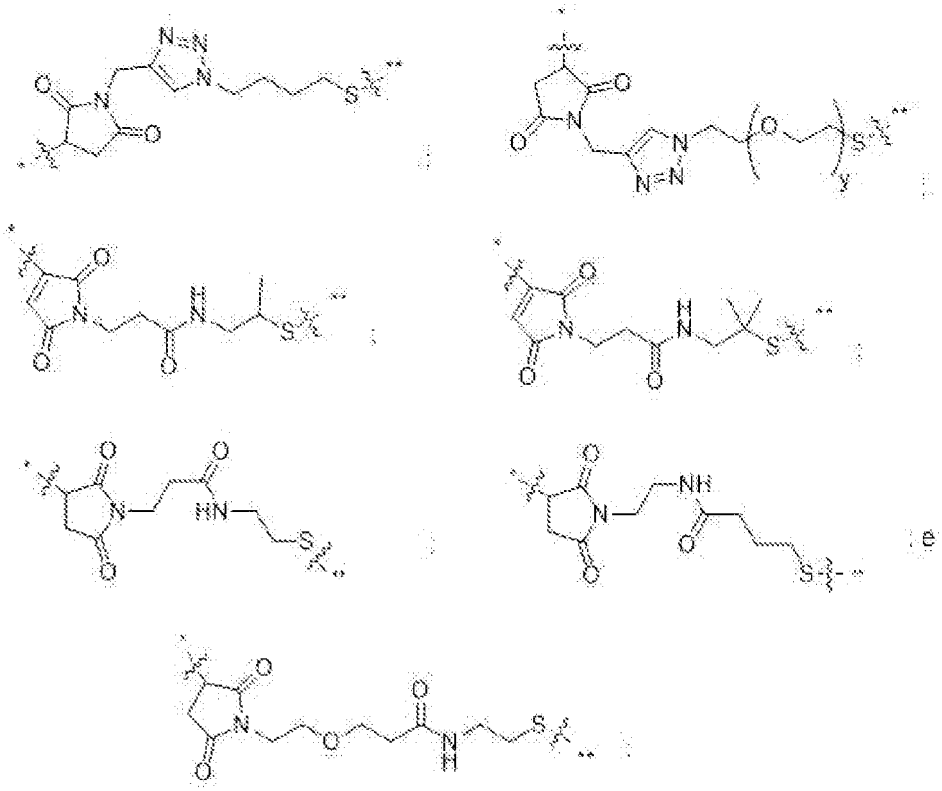
em que * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol de uma porção de fármaco; e em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado.

21. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o referido ligante tem a seguinte Fórmula:



em que y é 1 a 11; * está ligado à funcionalidade tiol no anticorpo e ** está ligado à funcionalidade tiol da porção de fármaco.

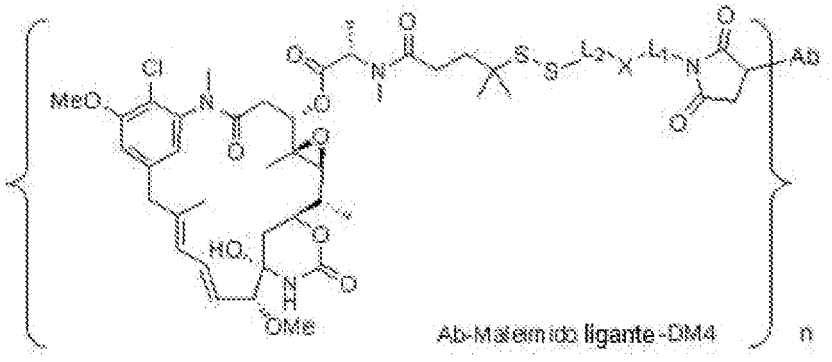
22. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, caracterizado pelo fato de que a referida porção de fármaco é selecionada de entre um grupo consistindo em um inibidor de V-ATPase, um agente pró-apoptótico, um inibidor de Bcl2, um inibidor de MCL1, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizante de microtúbulo,

um desestabilizante de microtúbulo, uma auristatina, uma dolastatina, um maitansinoide, uma MetAP (metionina aminopeptidase), uma auristatina, uma amanitina, uma pirrolobenzodiazepina, um inibidor de RNA, um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, inibidores de proteassomos, inibidores de reações de transferência de fosforila em mitocôndrias, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de quinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de quinesina, um inibidor de HDAC, um agente de danificação de DNA, um agente alquilante de DNA, um intercalante de DNA, um aglutinante de sulco menor de DNA e um inibidor de DHFR.

23. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o agente citotóxico é um maitansinoide.

24. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o maitansinoide é N(2')- diacetil-N(2')-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina (DM1), N(2')-deacetil-N(2')-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3) ou N(2')-diacetil-N2-(4- mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

25. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24, possuindo a seguinte Fórmula (VIII):



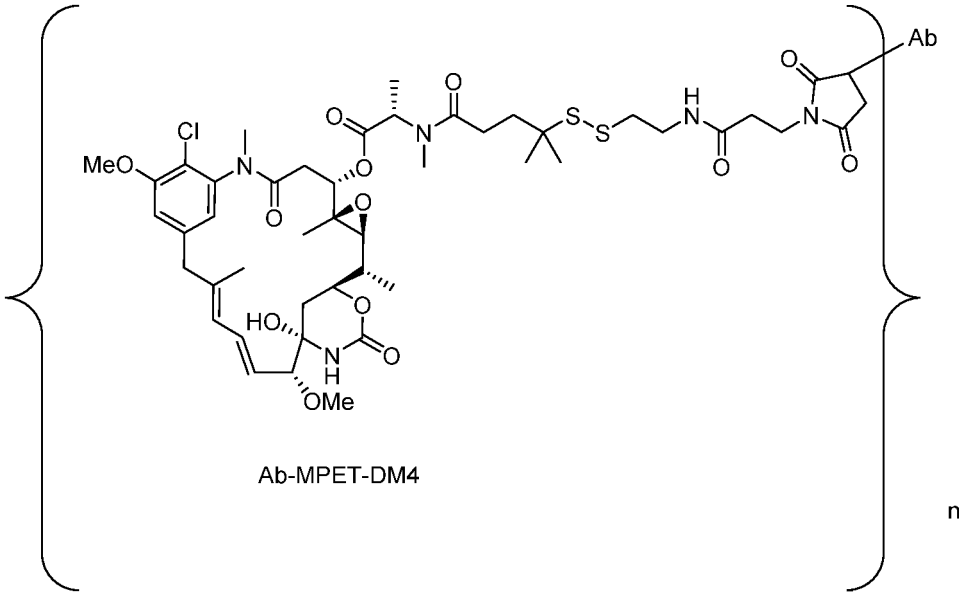
(VIII)

caracterizado pelo fato de que L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado; e em que n é cerca de 3 a cerca de 4; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

26. Conjugado de anticorpo e fármaco, caracterizado pelo fato de que possui a seguinte fórmula:



Ab-MPET-DM4

n

em que n é cerca de 3 a cerca de 4 e Ab é um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:47, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:63; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

27. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

28. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o conjugado de anticorpo e fármaco, como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 26, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

29. Uso do conjugado de anticorpo e fármaco, como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 26, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que se destina ao preparo de um medicamento para tratamento ou prevenção de um câncer que expressa CCR7 em um paciente necessitado do mesmo.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o conjugado de anticorpo e fármaco ou composição farmacêutica são para ser administrados ao paciente em combinação com um ou mais compostos terapêuticos adicionais.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o um ou mais compostos terapêuticos adicionais são selecionados de um padrão de tratamento quimioterapêutico, uma molécula coestimulatória ou um inibidor de ponto de verificação (*checkpoint*).

32. Uso, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a molécula coestimulatória é selecionada a partir de um agonista de ligante OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, STING ou CD83.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação é selecionado a partir de um inibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e/ou TGFR beta.

34. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 26, ou composição farmacêutica, como definida na reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que se destinam ao uso como um medicamento.

35. Conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 15 a 26, ou composição farmacêutica, como definida na reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que se destinam ao uso no tratamento ou prevenção de um câncer expressando CCR7 em um paciente necessitado do mesmo.

36. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, o conjugado de anticorpo e fármaco, como definido na reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que o câncer expressa CCR7.

37. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33 e 36, ou conjugado de anticorpo e fármaco, como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 26, 34 e 35, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), carcinoma gástrico, câncer do pulmão de células não pequenas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer da cabeça e do pescoço, carcinoma nasofaríngeo (NPC), câncer do esôfago, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer da tireoide, câncer da mama, câncer de células renais e câncer do colo do útero.

38. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, 36 e 37, ou conjugado de anticorpo e fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 26, 34 e 35, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em leucemia linfoide crônica (CLL), linfomas de célula T periférica (PTCL) tal como leucemia/linfoma de célula T adulto (ATLL) e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma não Hodgkin (NHL) tal como linfoma de células do manto (MCL), linfoma de Burkitt e linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) e câncer do pulmão de células não pequenas.

39. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

40. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 14, 16, 30, 32, 46, 48, 62, 64, 78, 80, 94, 96, 481, 483, 497 ou 499.

41. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, como definido na reivindicação 39 ou 40.

42. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, como definido na reivindicação 41, ou o ácido nucleico, como definido na reivindicação 39 ou 40.

43. Processo para produção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 42, e recuperar o anticorpo da cultura celular.

44. Processo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a recuperação do anticorpo a partir da cultura celular compreende as etapas de:

a) remover células e filtrar a cultura;

b) purificar a cultura por cromatografia de afinidade;

c) inativar quaisquer vírus na cultura ajustando o pH para 3,4-3,6, reajustando depois o pH para 5,8-6,2 e filtrando a cultura;

d) purificar a cultura por meio de cromatografia de troca catiônica e realizar redução da cultura dentro da coluna;

e) realizar cromatografia de troca aniônica na cultura;

f) remover vírus por nanofiltração;

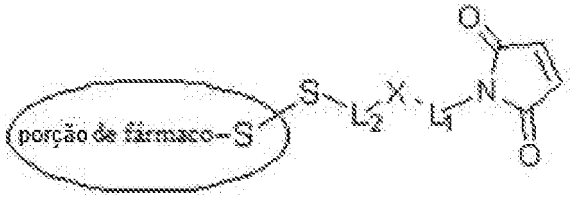
g) filtrar a cultura contendo o anticorpo; e

h) obter anticorpo purificado.

45. Processo para produção de um conjugado de anticorpo

anti-CCR7 e fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



em que:

a porção de fármaco é DM1, DM3 ou DM4 e a porção de fármaco está ligada ao ligante através da sua funcionalidade tiol;

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

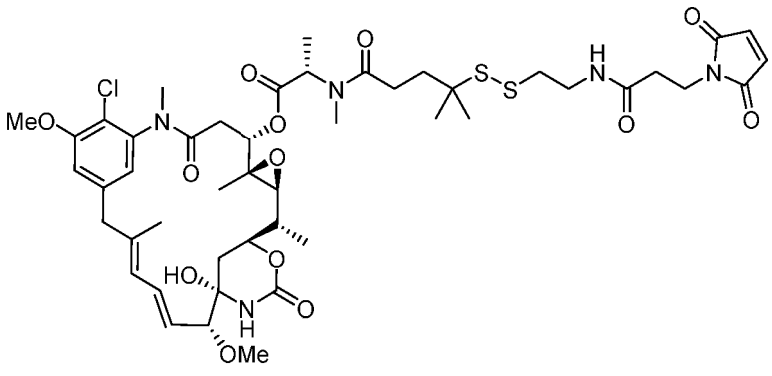
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado;

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo recuperado da cultura celular, como definido na reivindicação 44, para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

46. Processo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que compreende:

(d) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



e

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo recuperado da cultura celular, como definido na reivindicação 44, para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

47. Processo para produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:



em que:

a porção de fármaco é DM1, DM3 ou DM4 e a porção de fármaco está ligada ao ligante através da sua funcionalidade tiol;

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11;

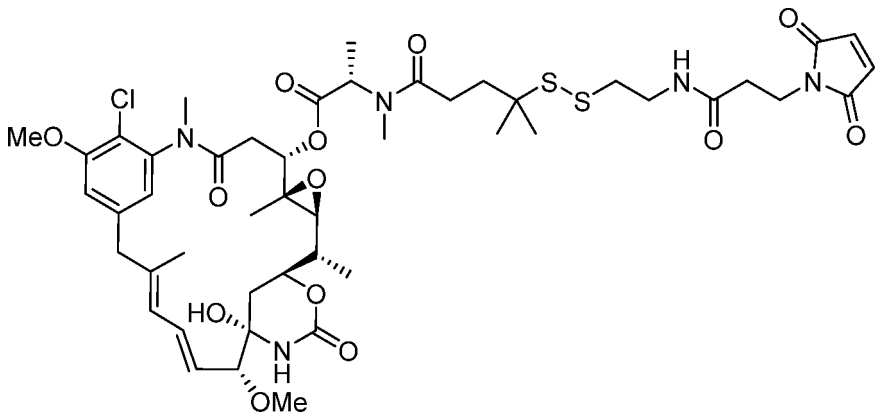
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol; e alquileno é linear ou ramificado;

(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

48. Processo para produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) pré-formar uma porção de ligante-fármaco da seguinte Fórmula:

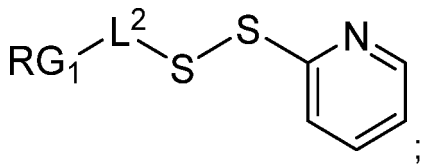


(b) conjugar a referida porção ligante-fármaco com o anticorpo, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, para produzir um conjugado de anticorpo e fármaco; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

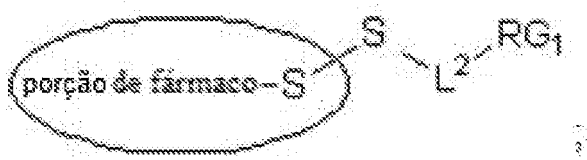
49. Processo, de acordo com a reivindicação 45 ou 47, caracterizado pelo fato de que a etapa de pré-formação da referida porção de ligante-fármaco compreende:

g) reagir uma porção de fármaco através da sua funcionalidade tiol com:

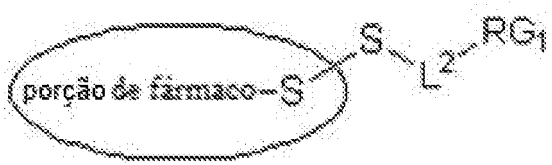


;

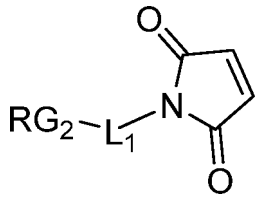
para formar:



h) reagir o

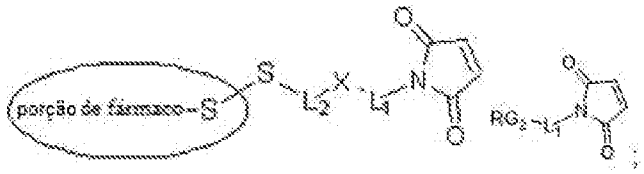


formado com:



;

para formar a porção de ligante-fármaco:



;

em que:

L^1 é um alquileno C_{1-6} em que um dos grupos metileno pode ser substituído por oxigênio;

L^2 é um alquileno C_{1-6} ou é $–(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ em que y é 1 a 11; e

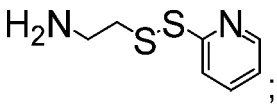
X é –C(O)-NH-, -NHC(O)- ou um triazol;

em que o alquileno é linear ou ramificado; e

RG1 e RG2 são 2 grupos reativos formando o grupo X.

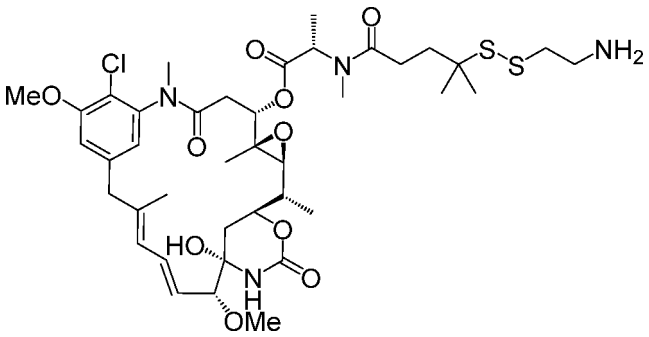
50. Processo, de acordo com a reivindicação 46 ou 48, caracterizado pelo fato de que a etapa de pré-formação da referida porção de ligante-fármaco compreende:

i) reagir a porção de fármaco através da sua funcionalidade de tiol com:



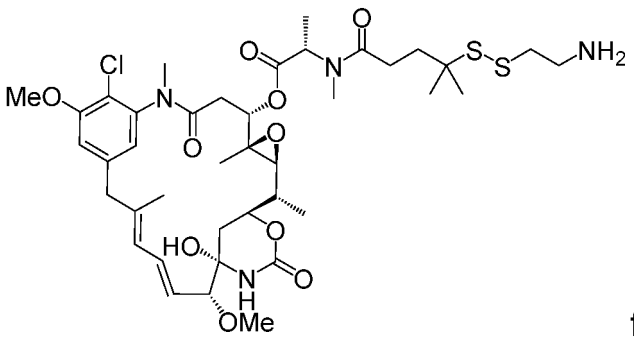
;

para formar:

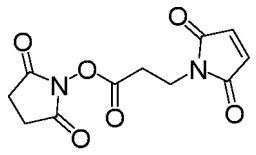


;

j) reagir o

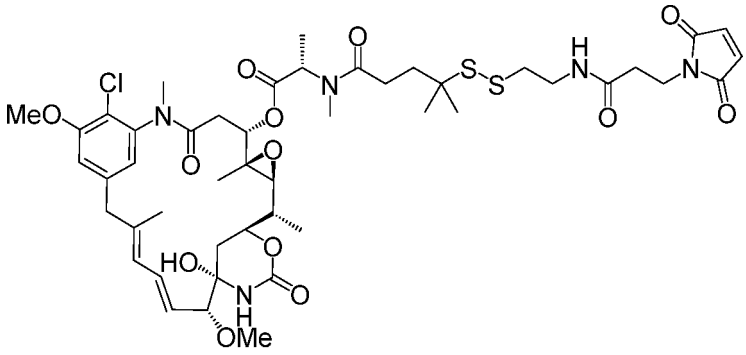


formado com:



;

para formar a porção de ligante-fármaco:



51. Conjugado de anticorpo e fármaco, produzido de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 50, caracterizado pelo fato de que tem uma DAR média, medida com um espectrofotômetro UV, de cerca de 3 a cerca de 4.

52. Processo para produção de um conjugado de anticorpo anti-CCR7 e fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) ligar quimicamente SMCC ou MPET a uma porção de fármaco DM-1 ou DM-4 para formar um ligante-fármaco;

(b) conjugar o referido ligante-fármaco com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1a 14; e

(c) purificar o conjugado de anticorpo e fármaco.

53. Conjugado de anticorpo e fármaco, produzido de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que tem uma DAR

média, medida com um espectrofotômetro UV, de cerca de 3 a cerca de 4.

54. Reagente de diagnóstico, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

55. Reagente de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno é marcado com um radiomarcador, um fluoróforo, um cromóforo, um agente de imagiologia ou um íon metálico.

56. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

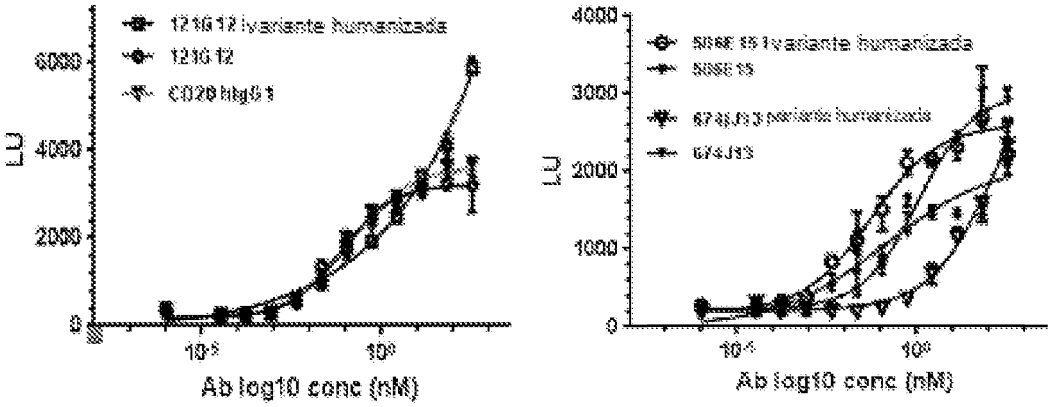


Figura 1

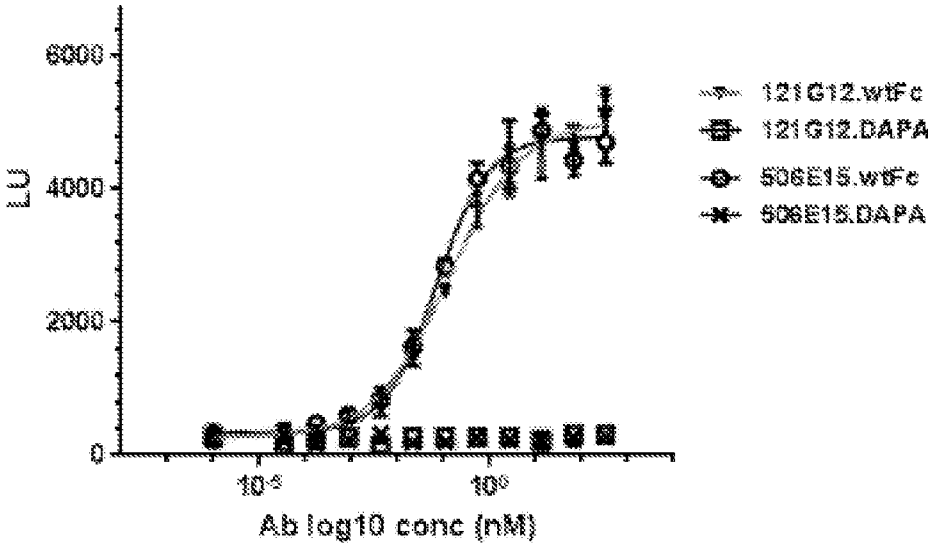


Figura 2

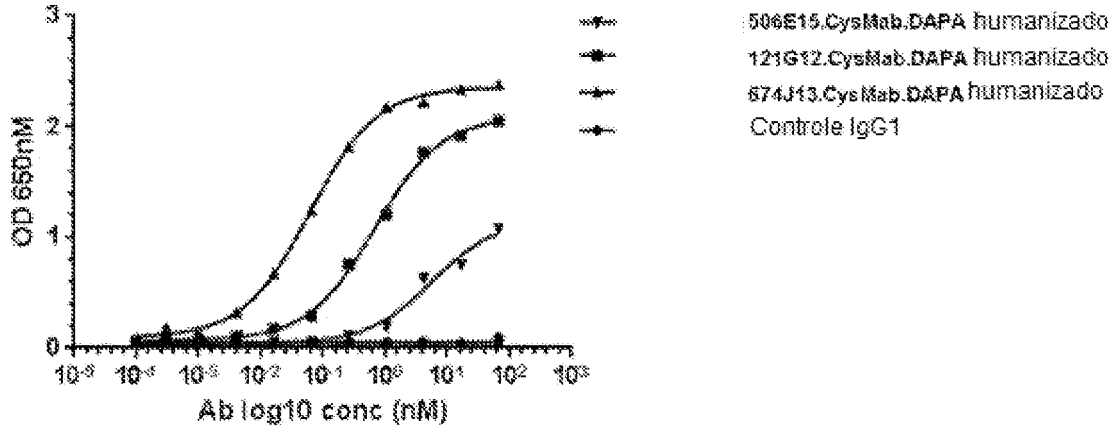


Figura 3

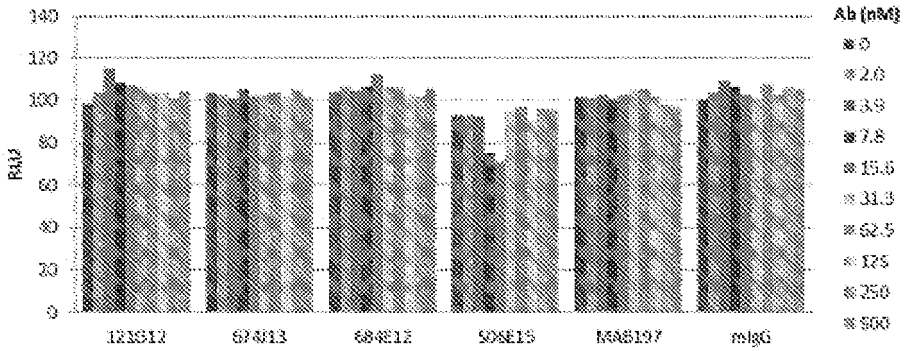


Figura 4A

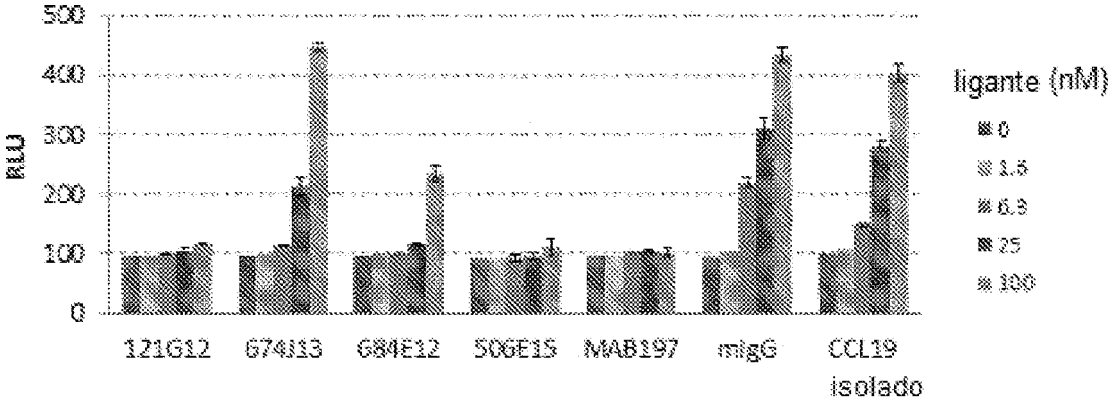


Figura 4B

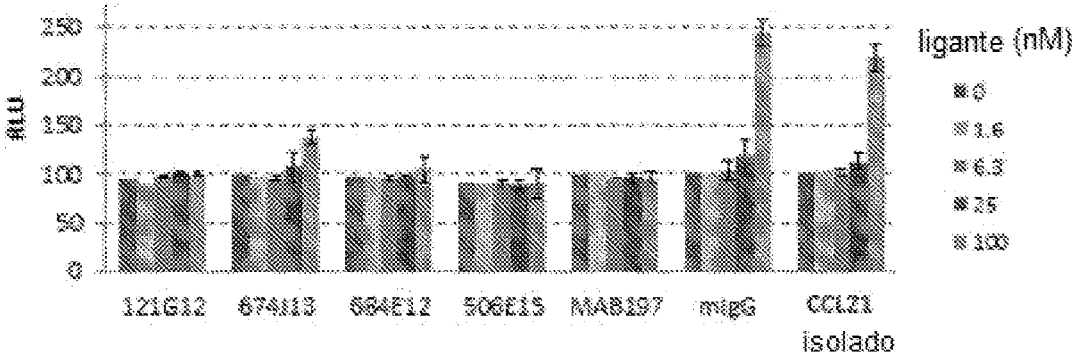


Figura 4C

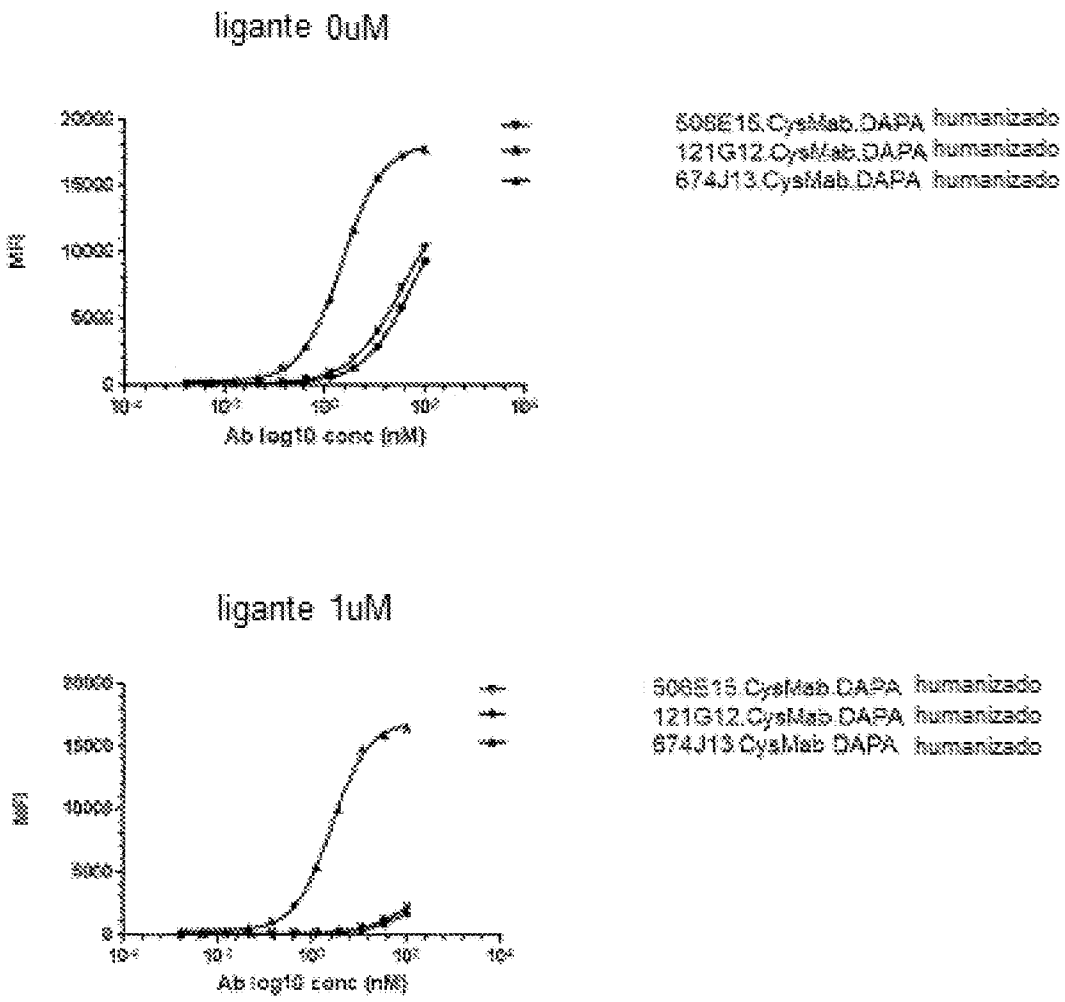

ligante 0uM
MFI
20000
15000
10000
5000
0
Ab log10 conc (nM)
509E15.CysMab.DAPA humanizado
121G12.CysMab.DAPA humanizado
674J13.CysMab.DAPA humanizado
ligante 1uM
MFI
20000
15000
10000
5000
0
Ab log10 conc (nM)
509E15.CysMab.DAPA humanizado
121G12.CysMab.DAPA humanizado
674J13.CysMab.DAPA humanizado

Figura 5

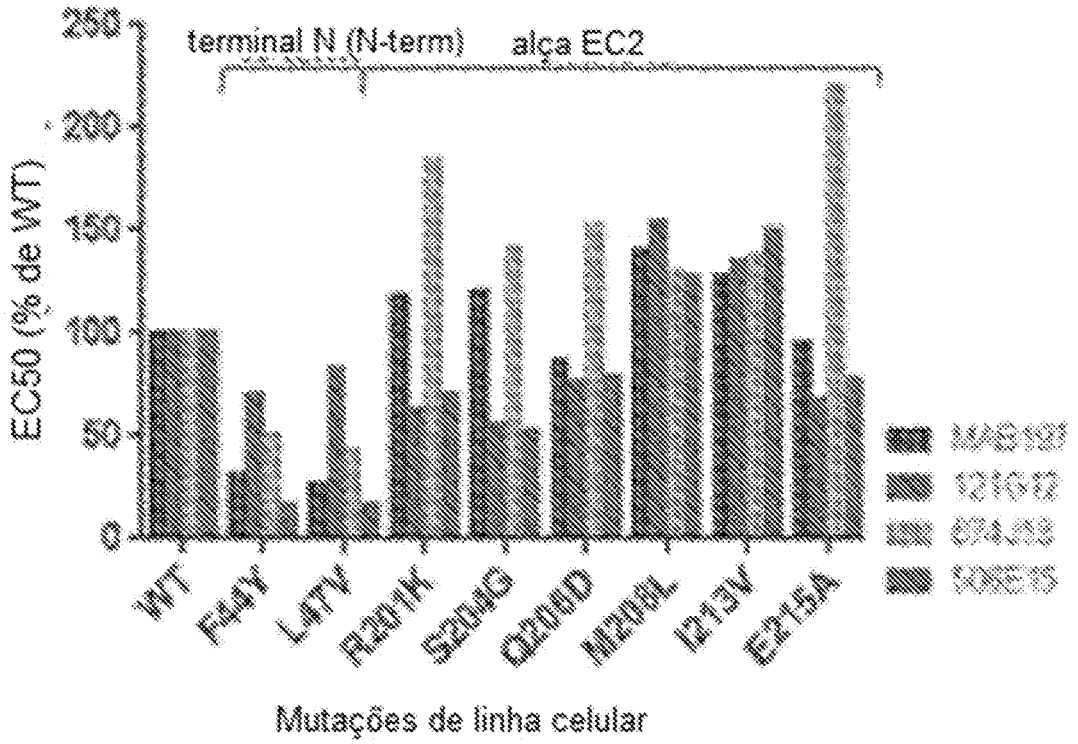

terminal N (N-term)
alça EC2
EC50 (% de WT)
250
200
150
100
50
0
WT
F44Y
L47V
R201K
S204G
Q206D
M209L
I213V
E215A
Mutações de linha celular

Figura 6

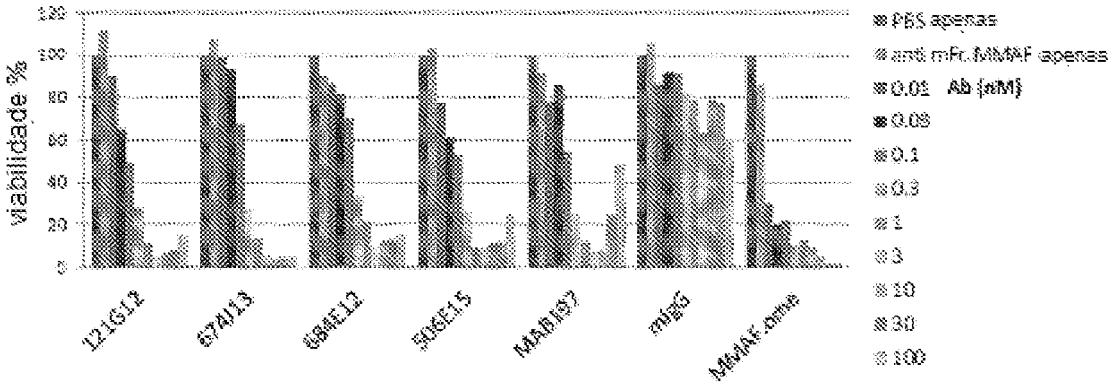


Figura 7A

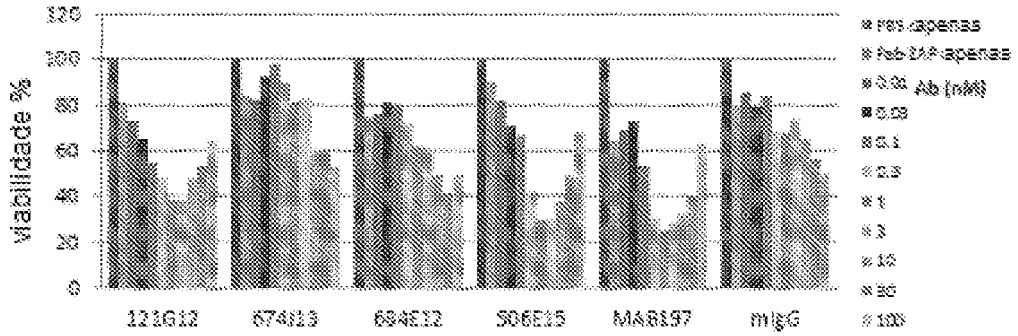


Figura 7B

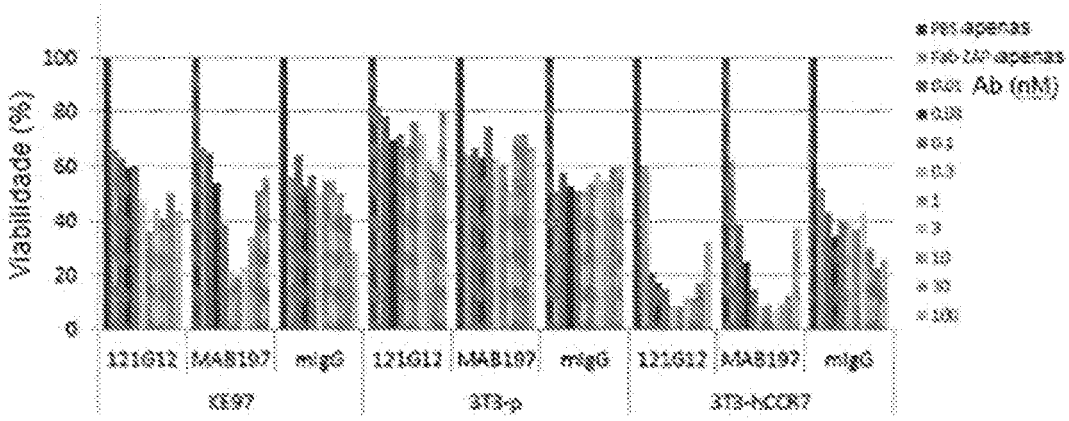


Figura 8

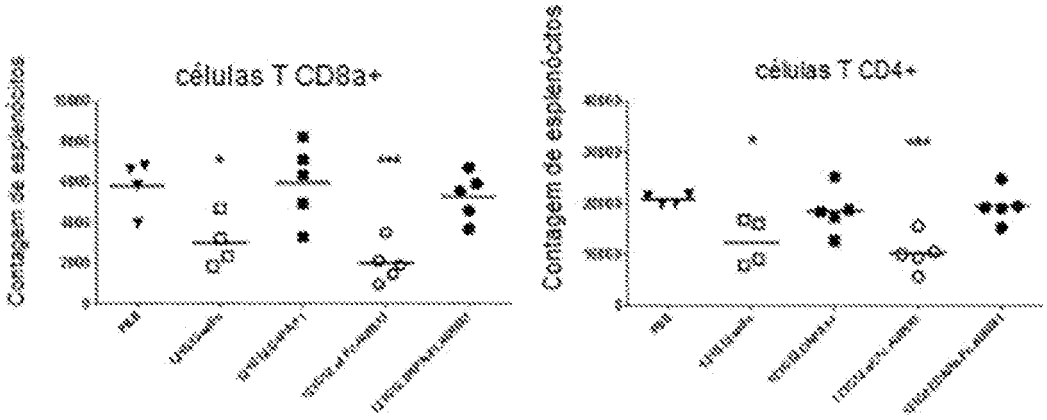


Figura 9

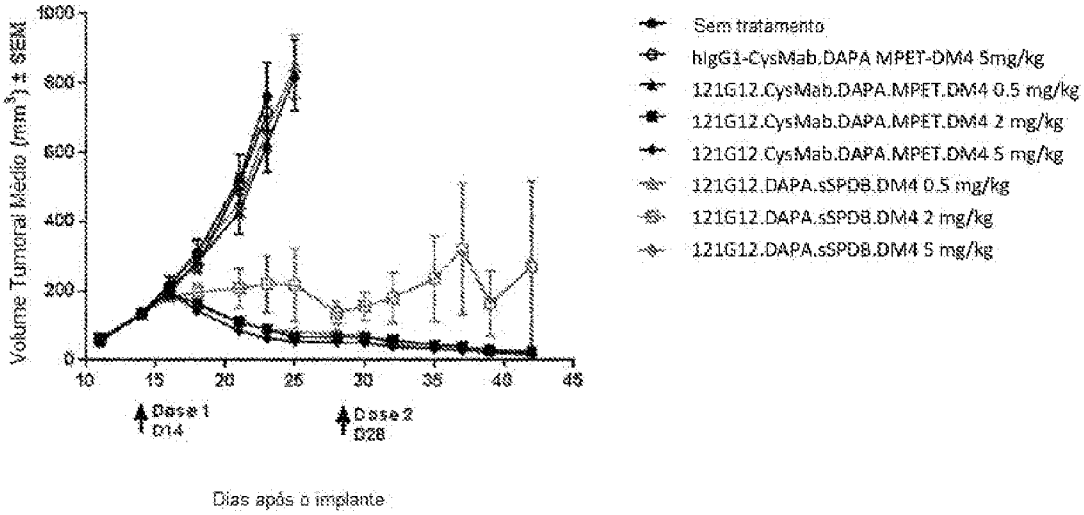


Figura 10

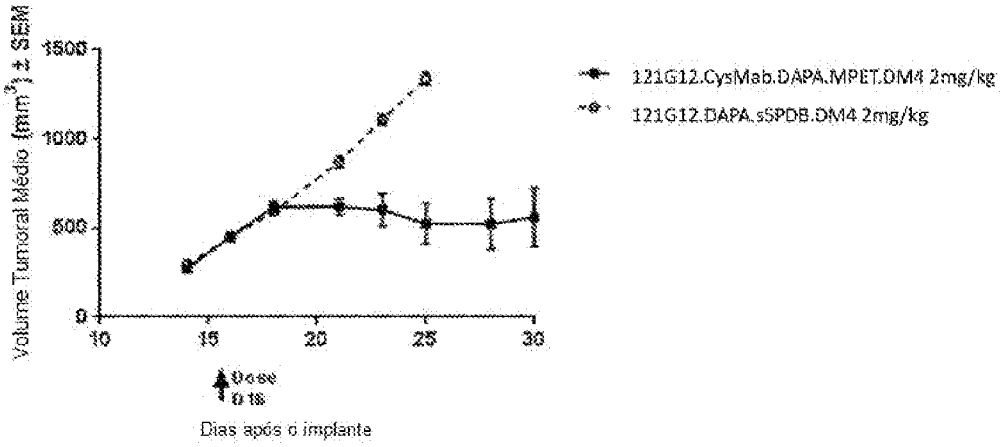


Figura 11

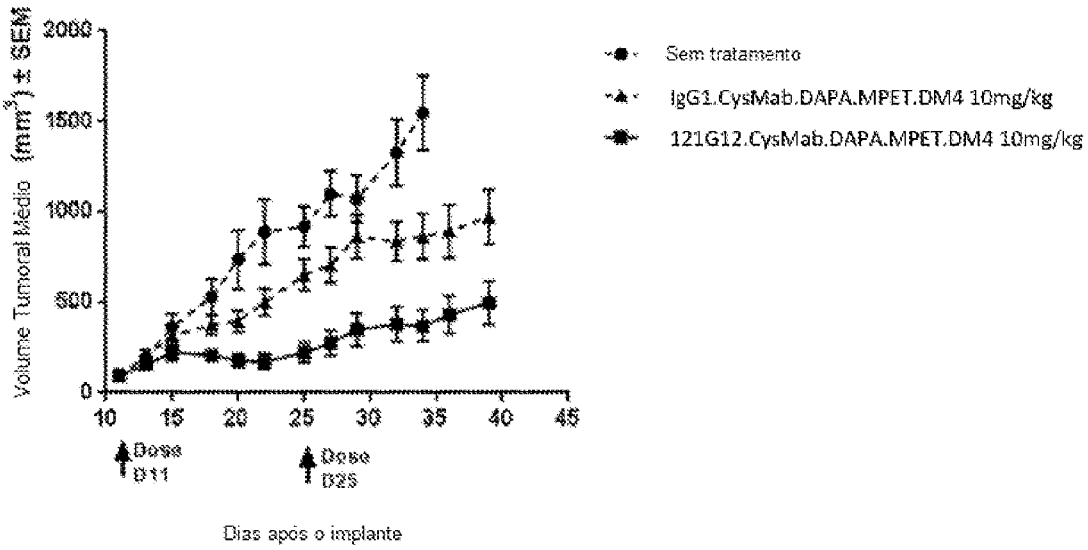


Figura 12

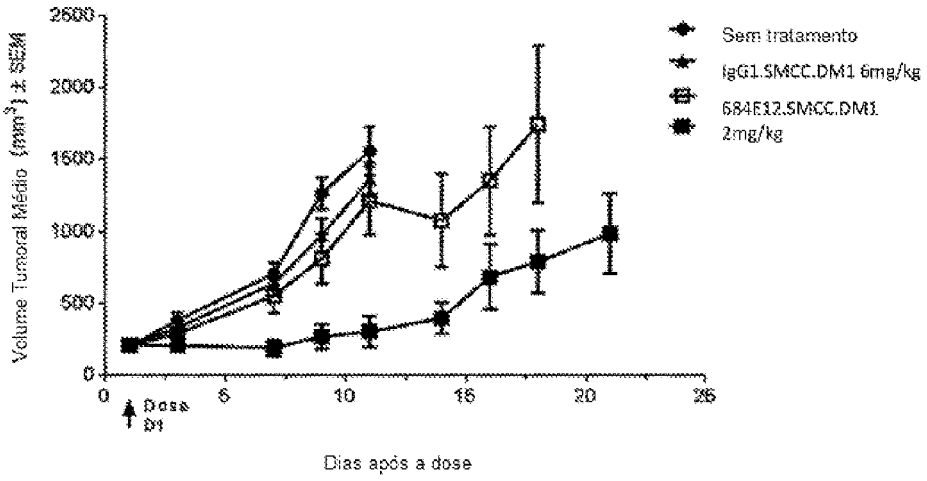


Figura 13

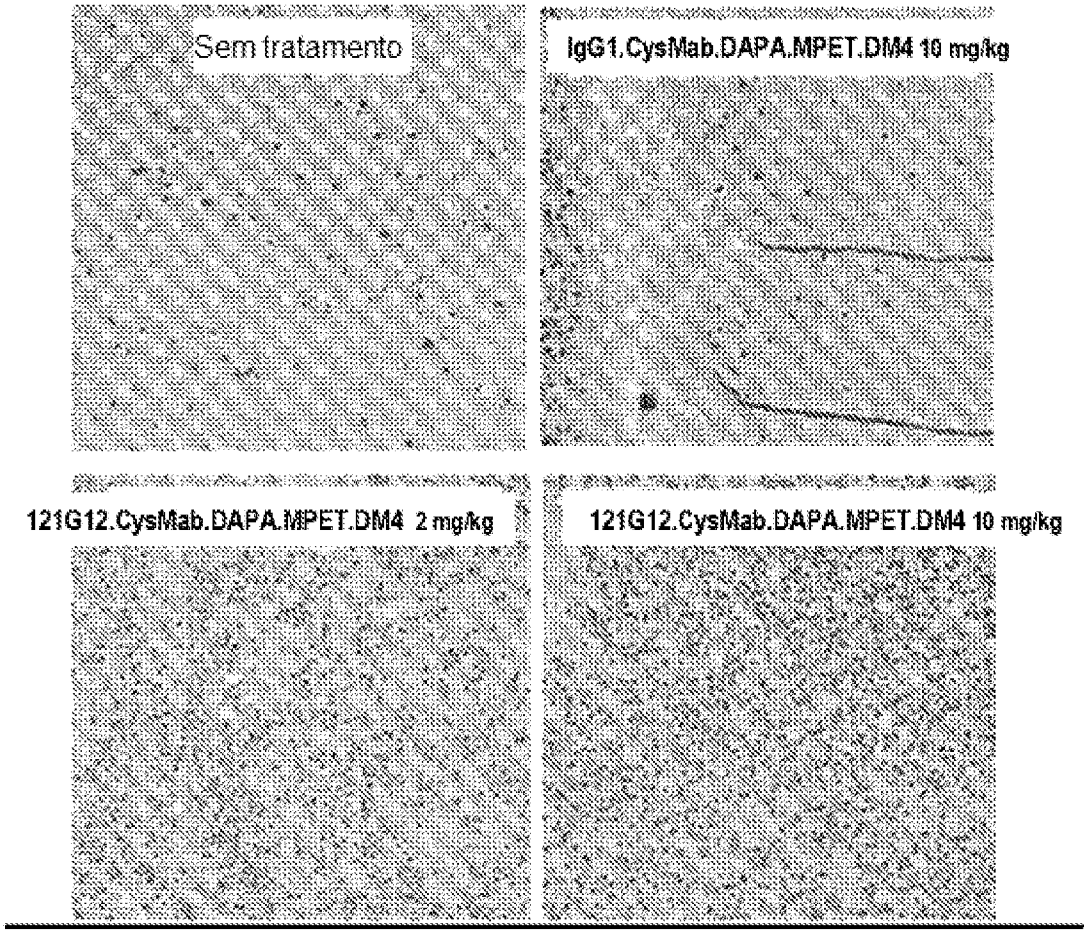

Sem tratamento
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 10 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 10 mg/kg

Figura 14A

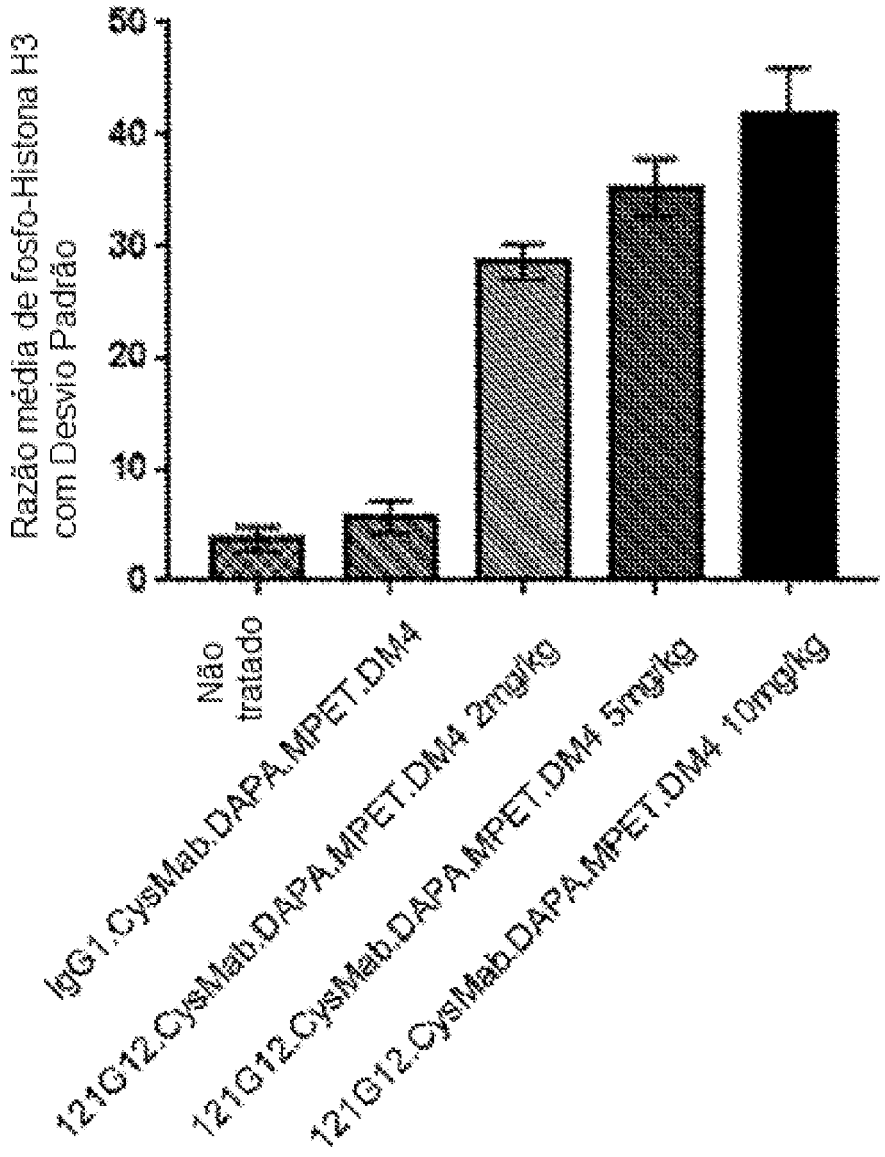

Razão média de fosfo-Histona H3 com Desvio Padrão
0
10
20
30
40
50
Não tratado
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 5mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 10mg/kg

Figura 14B

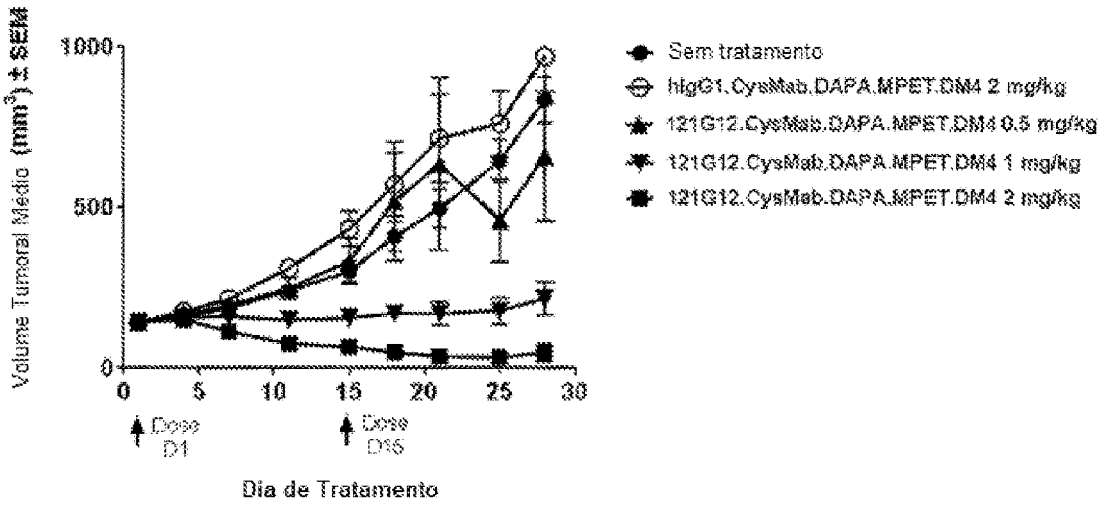

Volume Tumoral Medio (mm3) ± SEM
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Dose D1
Dose D15
Dia de Tratamento
Sem tratamento
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 0.5 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 1 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg

Figura 15

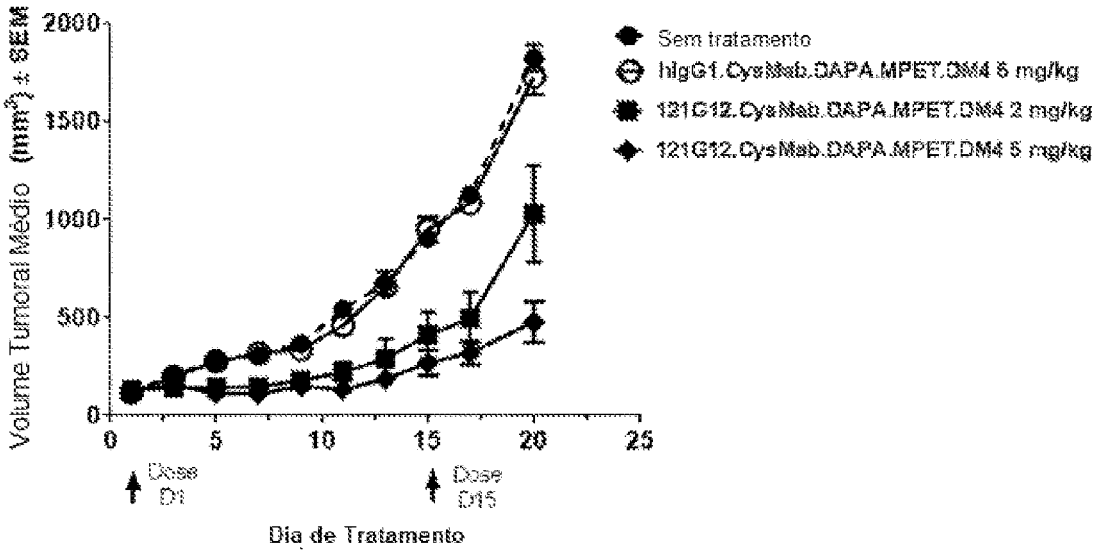

Volume Tumoral Médio (mm³) ± SEM
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
Dose D1
Dose D15
Dia de Tratamento
Sem tratamento
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 6 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 6 mg/kg

Figura 16

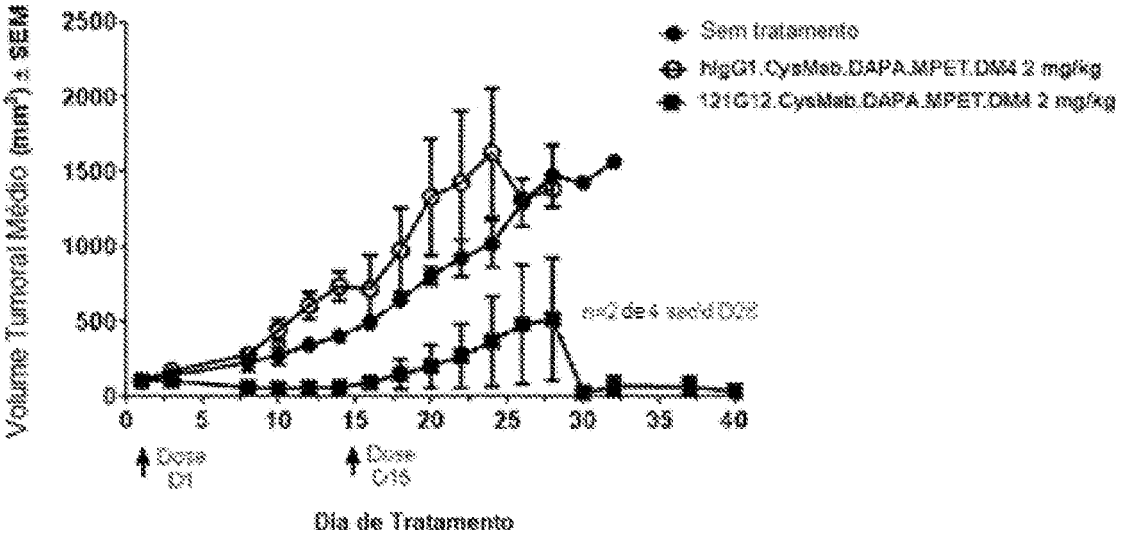

Volume Tumoral Médio (mm³) ± SEM
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dose
D1
Dose
D15
Dia de Tratamento
Sem tratamento
Hg01.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg
131C12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg

Figura 17

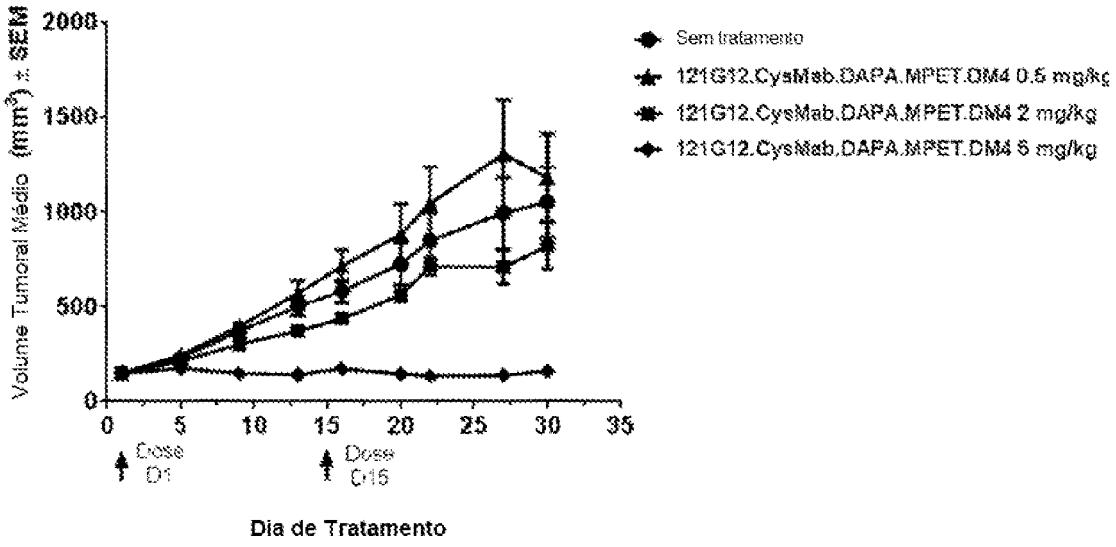

Volume Tumoral Médio (mm³) ± SEM
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Dose D1
Dose D15
Dia de Tratamento
Sem tratamento
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 0.5 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 2 mg/kg
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 5 mg/kg

Figura 18

RESUMO

Patente de Invenção: **"CONJUGADOS DE ANTICORPO ANTI-CCR7 E FÁRMACO"**.

Este pedido divulga anticorpos anti-CCR7, seus fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco dos referidos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno. A invenção também se relaciona com métodos de tratamento ou prevenção de câncer utilizando os anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco. Também são aqui divulgados métodos de produzir os anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno e conjugados de anticorpo e fármaco, e métodos de usar os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno como reagentes de diagnóstico.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p241310 LISTAGEM DE SEQUÊNCIA.TXT
- Data de Geração do Código: 01/08/2019
- Hora de Geração do Código: 13:18:15
- Código de Controle:
  - Campo 1: C20DC7DE03A749CC
  - Campo 2: EF5343756B5EA525