



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

(21) BR 112019012483-7 A2



(22) Data do Depósito: 19/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) **Título:** CONJUGADOS DE FÁRMACO DE ANTICORPO PARA ABLAR CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

(51) **Int. Cl.:** A61K 47/68; C07K 16/28; A61P 43/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 16/06/2017 US 62/520,854; 21/12/2016 US 62/437,622.

(71) **Depositante(es):** NOVARTIS AG.

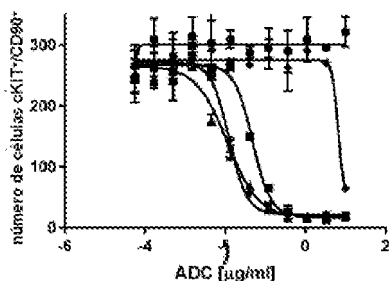
(72) **Inventor(es):** BEN WEN; ANTHONY E. BOITANO; MATTHEW BURGER; SUSAN E. CELLITTI; MICHAEL P. COOKE; CATRIN FINNER; BERNHARD HUBERT GEIERSTANGER; YUNHO JIN; SI TUEN LEE-HOEFLICH; HONGNGOC THI PHAM; SIEW HO SCHLEYER; KATHRIN TISSOT; TETSUO UNO.

(86) **Pedido PCT:** PCT IB2017058159 de 19/12/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/116178 de 28/06/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 17/06/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção fornece conjugados de fármaco de anticorpo, em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano é ligado a uma porção química de fármaco, opcionalmente através de um ligante. A presente invenção fornece ainda composições farmacêuticas que compreendem os conjugados de fármaco de anticorpo; e métodos de produção e uso de tais composições farmacêuticas para ablar células-tronco hematopoéticas em um paciente que necessita das mesmas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUGADOS DE FÁRMACO DE ANTICORPO PARA ABLAR CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS"**.

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US nº 62/437,622 depositado em 21 de dezembro de 2016, e Pedido Provisório US nº 62/520,854 depositado em 16 de junho de 2017, cujo teor é incorporado a este documento a título de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente descrição é direcionada a conjugados de fármaco de anticorpo anti-cKIT, e seus usos para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[003] O presente pedido contém uma Listagem de Sequência que foi submetida eletronicamente em formato e é incorporado a este documento a título de referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 14 de dezembro de 2017, é nomeada PAT057400-WO-PCT_SL.TXT e tem 209.938 bytes de tamanho.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] cKIT (CD117) é uma tirosina quinase receptora de transmembrana única que se liga ao Fator de Célula-Tronco de ligante (SCF). SCF induz homodimerização de cKIT que ativa sua atividade de tirosina quinase e sinais através de ambas as vias PI3-AKT e MAPK (Kindblom et al., Am J. Path. 1998 152(5):1259). cKIT foi inicialmente constatado como um oncogene como uma forma truncada expressa por um retrovírus felino (Besmer et al., Nature 1986 320:415-421). A clonagem do gene humano correspondente demonstrou que cKIT é um membro da classe de tipo III de tirosina quinases recepto-

ras, que contam entre os membros de família, FLT3, receptor de CSF-1 e receptor de PDGF. cKIT é necessário para o desenvolvimento de células hematopoiéticas, células de germe, mastócitos e melanócitos. Células progenitoras hematopoiéticas, por exemplo, células-tronco hematopoiéticas (HSC), na medula óssea, expressam alto nível de cKIT na superfície celular. Adicionalmente, mastócitos, melanócitos na pele, e células intersticiais de Cajal no trato digestivo expressam cKIT.

[005] Células-tronco hematopoiéticas (HSCs) têm capacidade de regenerar todas as células sanguíneas e imunológicas em um recipiente de transplante e, portanto, têm grande potencial terapêutico. O transplante de célula-tronco hematopoiética é amplamente usado como terapias para leucemia, linfoma, e outras doenças com risco de vida. Muitos riscos, no entanto, são associados a tal transplante, que inclui fraco enxertamento, rejeição imunológica, doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD), ou infecção. O transplante de célula-tronco hematopoiética alogênica geralmente precisa de condicionamento do recipiente através de tratamentos citorredutivos para evitar a rejeição imunológica do enxerto. Regimes de condicionamento atuais são frequentemente tão tóxicos ao hospedeiro que os mesmos são contraindicados para grandes grupos de pacientes de transplante e/ou não podem ser fornecidos em quantidades suficientes para evitar doença de enxerto versus hospedeiro. Desse modo, há uma necessidade de aprimorar os métodos de condicionamento e transplante e diminuir os riscos associados a transplante de célula-tronco hematopoiética e aumentar sua eficácia para vários distúrbios.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente descrição fornece conjugados de fármaco de anticorpo, em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxi-

co), opcionalmente através de um ligante. Aqueles conjugados de fármaco de anticorpo podem entregar seletivamente um agente citotóxico às células que expressam cKIT, por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, ablam seletivamente assim aquelas células em um paciente, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética. Preferencialmente, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT têm propriedades farmacocinéticas de modo que o mesmo não estará presente e/ou ativo em uma circulação de paciente por um tempo estendido, de modo que os mesmos possam ser usados para condicionar recipientes de transplante de célula-tronco hematopoiética antes do transplante de célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, são fornecidos no presente documento conjugados que compreendem um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT, ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. De modo surpreendente, os presentes inventores constataram que os anticorpos anti-cKIT de comprimento total (por exemplo, IgGs de comprimento total), fragmentos de F(ab')₂, e conjugados de toxina dos mesmos causam degranulação de mastócito, mas os conjugados de toxina de Fab' ou Fab anti-cKIT não causam degranulação de mastócito, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores conforme poderia ser observado se um paciente desenvolvesse ou tivesse anticorpos antifármacos pré-existentes que reconhecem fragmentos de Fab. A presente descrição fornece adicionalmente composições farmacêuticas que compreendem os conjugados de fármaco de anticorpo, e métodos de produção e uso de tais composições farmacêuticas para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética.

[007] Em um aspecto, a presente descrição é direcionada a um

conjugado de Fórmula (I):



[008] em que:

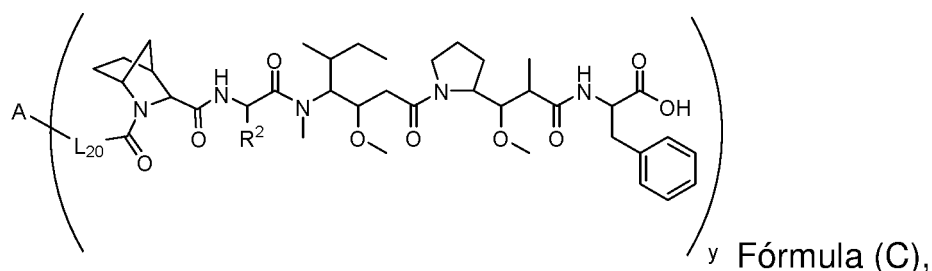
[009] A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano;

[0010] L_B é um ligante;

[0011] D é um agente citotóxico;

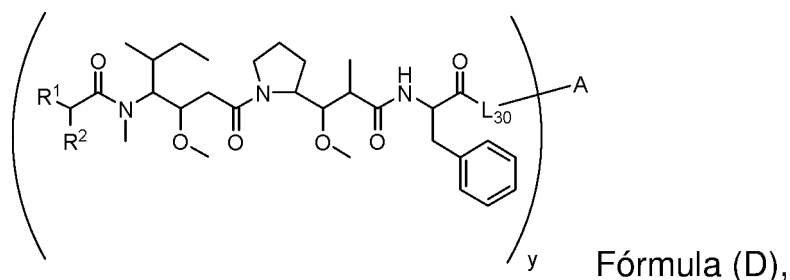
[0012] n é um número inteiro de 1 a 10, e y é um número inteiro de 1 a 10.

[0013] Em um aspecto, a presente descrição é direcionada a um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C):



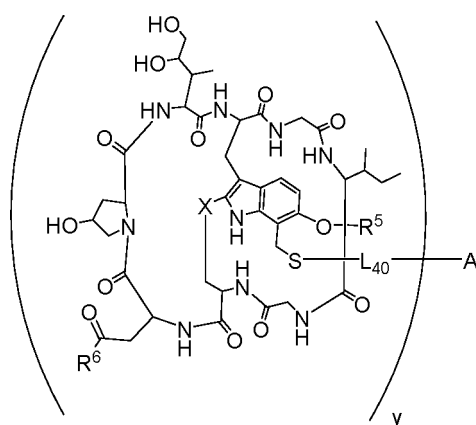
[0014] em que A, L_{20} , y e R^2 , são conforme definidos no presente documento.

[0015] Em um aspecto, a presente descrição é direcionada a um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D):



[0016] em que A, L_{30} , y, R^1 e R^2 , são conforme definidos no presente documento.

[0017] Em um aspecto, a presente descrição é direcionada a um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E):



Fórmula (E),

[0018] em que A, L₄₀, y, X, R⁵ e R⁶, são conforme definidos no presente documento.

[0019] Em outro aspecto, são fornecidos no presente documento anticorpos e fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se ligam especificamente a cKIT humano. Tais anticorpos e fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') anti-cKIT podem ser usados em qualquer um dos conjugados descritos no presente documento.

[0020] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente ao domínio extracelular de cKIT humano (SEQ ID NO: 112).

[0021] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a um epítopo nos domínios 1 a 3 de cKIT humano (SEQ ID NO: 113).

[0022] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') descrito na Tabela 1.

[0023] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de an-

ticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 1, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0024] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 5; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[0025] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0026] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 8; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0027] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 27, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0028] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de an-

ticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 30, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 31; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 44; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 45.

[0029] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 32, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0030] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 33, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 34; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 35; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 46; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0031] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 1, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0032] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 52; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[0033] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de an-

ticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0034] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 53; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0035] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 60, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0036] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 63, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 64; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 78; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 80.

[0037] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 65, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0038] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de an-

ticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 66, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 67; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 68; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 81; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0039] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 86, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0040] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 89, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 90; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 104; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 106.

[0041] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 91, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0042] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 92, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 93; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 94; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 107; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0043] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de an-

ticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma região variável de cadeia leve (VL) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[0044] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

[0045] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[0046] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0047] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108.

[0048] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0049] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0050] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0051] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0052] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0053] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122.

[0054] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

[0055] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

[0056] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

[0057] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134.

[0058] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.

[0059] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

[0060] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

[0061] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 119, 120 ou 121, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0062] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 125, 126, ou 127, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0063] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 131, 132, ou 133, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0064] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 137, 138, ou 139, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0065] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 142, 143, ou 144, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0066] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID

NO: 25.

[0067] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0068] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0069] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0070] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0071] Em algumas modalidades, são fornecidos no presente documento conjugados que compreendem um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT (Fab ou Fab' anti-cKIT), ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. O Fab ou Fab' anti-cKIT pode ser qualquer um dentre os Fab ou Fab' descritos no presente documento, por exemplo, qualquer um dentre os Fab ou Fab' na Tabela 1. Conforme descrito no presente documento, tais conjugados de toxina de Fab' ou Fab anti-cKIT têm capacidade de ablar

células de HSC humana *in vitro* e *in vivo*, mas não causam degranulação de mastócito mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores.

BREVES DESCRIÇÕES DOS DESENHOS

[0072] **A Figura 1** é um gráfico de linha que mostra todos os conjugados DAR4 Fab'-(1) anti-cKIT testados (consultar a Tabela 2 para detalhes de conjugado) células-tronco e progenitoras humanas eliminadas (células cKIT⁺ / CD90⁺) *in vitro* com potência aproximadamente igual: J3 (quadrados); J2 (triângulos para cima); J1 (triângulos para baixo). Um ADC de controle, J6 (losangos), não eliminou HSCs humanas conforme comparado a controle de PBS (círculos).

[0073] **A Figura 2** é um gráfico de linha que mostra tanto J4 (quadrados) e J5 (triângulos) conjugados anti-cKIT eliminaram HSCs a longo prazo de camundongo (células cKIT⁺). J5 (triângulos) foi mais potente do que J4 (quadrados) nesse ensaio de eliminação de HSC de camundongo. Um ADC de controle, J6 (losangos) não eliminou HSCs de camundongo conforme comparado a controle de PBS (círculos).

[0074] **As Figuras 3A a 3L** são gráficos de linha que mostram resultados representativos de ensaios de degranulação de mastócito humano *in vitro*, que usaram mastócitos derivados de HSC de sangue periférico humano e liberação de beta-hexosaminidase como o mostrador (analisados por absorbância em 405 nm com subtração de linha de base com base em absorbância de referência em 620 nm). Os dados mostrados aqui foram coletados na ausência de SCF. **A Figura 3A** é um gráfico de linha que mostra titulação de quaisquer conjugados DAR4 Fab'-(1) anti-cKIT (símbolos fechados, linhas sólidas) ou anticorpos anti-cKIT de comprimento total (símbolos abertos, linhas pontilhadas) para vários clones anti-cKIT: Ab4/Fab'4 anti-cKIT (círculos), Ab3/Fab'3 anti-cKIT (quadrados), Ab2/Fab'2 anti-cKIT (triângulos para cima), Ab1/Fab'1 anti-cKIT (triângulos para baixo), e Ab/Fab' Anti-Her2

de controle (losangos). **A Figura 3B** é um gráfico de linha que mostra titulação de anti-IgE como um controle positivo para degranulação de mastócito. A degranulação de mastócito foi observada para todas as concentrações de anti-IgE testadas. **As Figuras 3C-3J** são gráficos de linha que mostram a nível de degranulação de mastócito acionado pelos conjugados DAR4 Fab'-(1) anti-cKIT (descrito na Tabela 2) ou controles de Ab anti-cKIT de IgG de comprimento total (descrito na Tabela 8) em várias concentrações: ausente (losangos abertos e linhas pontilhadas); 0,006 nM (triângulos); 0,098 nM (losangos); 1,56 nM (círculos); e 25 nM (quadrados), quando os agentes de teste foram reticulados com o uso de um anticorpo específico para a porção de Fab nos agentes de teste de anticorpo (titulado em eixo geométrico x). **As Figuras 3C e 3D** mostram que nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por J4 conjugado em todas as concentrações testadas (Figura 3C), enquanto o Ab4 anti-cKIT de comprimento total, quando reticulado, causou degranulação de mastócito (Figura 3D). **As Figuras 3E e 3F** mostram que nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por J1 conjugado em todas as concentrações testadas (Figura 3E), enquanto o Ab1 anti-cKIT de comprimento total, quando reticulado, causou degranulação de mastócito (Figura 3F). **As Figuras 3G e 3H** mostram que nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por J2 conjugado em todas as concentrações testadas (Figura 3G), enquanto o Ab2 anti-cKIT de comprimento total, quando reticulado, causou degranulação de mastócito (Figura 3H). **As Figuras 3I e 3J** mostram que nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por J3 conjugado em todas as concentrações testadas (Figura 3I), enquanto o Ab3 anti-cKIT de comprimento total, quando reticulado, causou degranulação de mastócito (Figura 3J). **As Figuras 3K e 3L** são gráficos de linha que mostram nenhuma degranulação de mastócito causada por conjugado J6 de controle (Figura 3K) ou anticorpo anti-Her2 de comprimen-

to total (Figura 3L) quando reticulado.

[0075] **A Figura 4** é uma plotagem de ponto que mostra números relativos de HSCs humanas presentes na medula óssea de camundongos NSG humanizados que seguem o tratamento com vários agentes. Conjugado J7 depletou HSCs humanas (quadrados) relativas ao controle de PBS (círculos), enquanto o conjugado J8 de controle (losangos) não se depletou de HSCs humanas na medula óssea.

[0076] **A Figura 5** é uma plotagem de ponto que mostra números relativos de HSCs humanas presentes na medula óssea de camundongos NSG humanizados que seguem o tratamento com vários agentes. Os conjugados DAR4 Fab'-(1) anti-cKIT depletaram HSCs humanas relativas ao controle de PBS (círculos). Os conjugados anti-cKIT (descritos na Tabela 2) testados foram: J3 (quadrados); J2 (triângulos para cima); J1 (triângulos para baixo). Os camundongos de controle tratados com J6 (losangos) não foram depletados de HSCs humanas na medula óssea.

[0077] **A Figura 6** é um gráfico de barras que mostra números relativos de HSCs presentes na medula óssea de camundongos C57Bl/6 que seguem o tratamento com vários agentes. Barra A = camundongos tratados com conjugado J4, Barra B = camundongos tratados com conjugado J5, Barra C = camundongos tratados com PBS.

[0078] **As Figuras 7A a 7I** são gráficos de linha que mostram resultados representativos de *in vitro* ensaios de degranulação de mastócito humano, que usaram mastócitos derivados de HSC de sangue periférico humano e liberação de beta-hexosaminidase como o mostrador (analisados por absorbância em 405 nm com subtração de linha de base com base em absorbância de referência em 620 nm). Os dados mostrados aqui foram coletados na ausência de SCF. Os gráficos de linha mostram níveis de degranulação de mastócito acionados por anticorpos ou fragmentos de anticorpo em várias concentrações: 0,006

nM (triângulos); 0,098 nM (losangos); 1,6 nM (círculos); e 25 nM (quadrados), quando os agentes de teste foram reticulados com o uso de um anticorpo específico para a porção de Fab nos agentes de teste de anticorpo (titulado em eixo geométrico x). **As Figuras 7A a 7C** mostram que Ab4 anti-cKIT de comprimento total (HC-E152C-S375C) (Figura 7A) e fragmento F(ab'4)₂ anti-cKIT (HC-E152C) conjugado com composto (4) (Figura 7B) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab4 (HC-E152C) em todas as concentrações testadas (Figura 7C). **As Figuras 7D a 7F** mostram que Ab3 anti-cKIT de comprimento total (HC-E152C-S375C) (Figura 7D) e fragmento F(ab'3)₂ (HC-E152C) conjugado ao composto (5) (Figura 7E) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab3 (E152C) conjugado ao composto (4) em todas as concentrações testadas (Figura 7F). **As Figuras 7G a 7I** são gráficos de linha que não mostram nenhuma degranulação de mastócito causada por anticorpo anti-Her2 (HC-E152C-S375C) (Figura 7G), fragmento anti-Her2-F(ab')₂ (HC-E152C) conjugado ao composto (4) (Figura 7H) ou fragmento anti-Her2-Fab (HC-E152C) conjugado ao composto (7) (Figura 7I) quando reticulado.

[0079] **As Figuras 8A a 8O** são gráficos de linha que mostram resultados representativos de ensaios de degranulação de mastócito humano *in vitro*, que usaram mastócitos derivados de HSC de sangue periférico humano e liberação de beta-hexosaminidase como o mostrador (analisados por absorbância em 405 nm com subtração de linha de base com base em absorbância de referência em 620 nm). Os dados mostrados aqui foram coletados na ausência de SCF. Os gráficos de linha mostram níveis de degranulação de mastócito acionados por anticorpos ou fragmentos de anticorpo em várias concentrações: 0,006

nM (triângulos); 0,098 nM (losangos); 1,6 nM (círculos); e 25 nM (quadrados), quando os agentes de teste foram reticulados com o uso de um anticorpo específico para a porção de Fab nos agentes de teste de anticorpo (titulado em eixo geométrico x). Para referência, o anticorpo reticulante sozinho é plotado em cada gráfico (losangos abertos, linha pontilhada). **As Figuras 8A a 8C** mostram que Ab4 anti-cKIT de comprimento total (Figura 8B) e fragmento F(ab'4)₂ anti-cKIT (Figura 8B) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab4 anti-cKIT (HC-E152C) em todas as concentrações testadas (Figura 8C). **As Figuras 8D a 8F** mostram que Ab1 anti-cKIT de comprimento total (Figura 8D) e fragmento F(ab'1)₂ anti-cKIT (Figura 8E) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab1 anti-cKIT (HC-E152C) em todas as concentrações testadas (Figura 8F). **As Figuras 8G a 8I** mostram que Ab2 anti-cKIT de comprimento total (Figura 8G) e fragmento F(ab'2)₂ anti-cKIT (Figura 8H) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab2 anti-cKIT (HC-E152C) em todas as concentrações testadas (Figura 8I). **As Figuras 8J a 8L** mostram que Ab3 anti-cKIT de comprimento total (Figura 8J) e fragmento F(ab'3)₂ anti-cKIT (Figura 8K) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab3 anti-cKIT (HC-E152C) em todas as concentrações testadas (Figura 8L). **As Figuras 8M a 8O** são gráficos de linha que não mostram nenhuma degranulação de mastócito causada por anticorpo anti-Her2 (Figura 8M), fragmento anti-Her2-F(ab')₂ (Figura 8N) ou fragmento anti-Her2-Fab (HC-E152C) (Figura 8O) quando reticulado.

[0080] **As Figuras 9A a 9C** representam resultados de ensaio de

eliminação *in vitro* com o uso de células humanas. HSCs de sangue periférico mobilizadas foram cultivadas com fatores de crescimento e o agente de teste determinado por 7 dias e a viabilidade foi medida por citometria de fluxo e contagem de células. Os agentes de teste DAR4 Fab' anti-cKit foram preparados com diferentes Fabs: Fab'1 (Figura 9A), Fab'2 (Figura 9B) ou Fab'3 (Figura 9C) anti-cKIT. As cargas úteis testadas foram C1 (quadrado aberto), mc-MMAF (círculo aberto), C5 (losango) ou C2 (triângulo). Os dados representam a média com desvio padrão e ajustes de curva de resposta de 3 parâmetros medidos no mesmo experimento.

[0081] **As Figuras 10A a 10D** são gráficos de linha que mostram o curso de tempo de estabelecimento de quimerismo de célula doadora em amostras de sangue coletadas de camundongos transplantados. Os camundongos C57BL/6J (n=5 para grupo tratado com anti-cKit ou n=2 para grupo tratado com PBS) receberam doses com 10 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (triângulos), 20 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (círculos) ou PBS (quadrados) infundidos durante sete dias e, então, transplantados dois dias depois com células doadoras CD45.1+. Dois animais de controle foram irradiados com 1100 RADS (losangos) um dia antes do transplante. Os gráficos de linha mostram as células doadoras percentuais (CD45.1+) medidas na população de todas as células (Figura 10A), células mieloides (Figura 10B), células B (Figura 10C) ou células T (Figura 10D) por análise FACS de amostras de sangue coletadas a cada ponto no tempo. Os dados representam média com erro padrão.

[0082] **As Figuras 11A a 11B** são gráficos de barra que mostram o quimerismo de célula doadora em amostras de sangue coletadas de camundongos transplantados. Os camundongos C57BL/6J (n=5 para grupo tratado com anti-cKit ou n=2 para grupo tratado com PBS) receberam doses com 10 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (tiras horizon-

tais), 20 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (tiras verticais), 40 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (sólido), 40 mg/kg Fab'5' anti-cKit-DAR4-mc-MMAF (quadriculado) ou PBS (bordas pretas, abertas) infundidos por cinco dias e, então, transplantados um dia depois com células doadoras CD45.1+. Dois animais de controle foram irradiados com 1100 RADS (sombreado) um dia antes do transplante. Os gráficos mostram as células doadoras percentuais (CD45.1+) medidas na população de todas as células (Figura 11A) ou células mieloides (Figura 11B) por análise FACS de amostras de sangue coletadas no dia 28 (barra esquerda para cada grupo) ou dia 56 (barra direita para cada grupo) após transplante. Os dados representam média com erro padrão.

[0083] **As Figuras 12A a 12B** são gráficos de linha que mostram o curso de tempo de estabelecimento de quimerismo de célula doadora em amostras de sangue coletadas de camundongos transplantados. Os camundongos C57BL/6J (n=5 para grupo tratado com anti-cKit ou n=2 para grupo tratado com PBS) foram irradiados com 300 RADS e três dias depois não receberam doses (quadrados) ou receberam doses com 10 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (triângulos), 20 mg/kg de Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (círculos) infundidos durante três dias e, então, transplantados dois dias depois com células doadoras CD45.1+. Um grupo adicional de 5 animais receberam apenas dose com 10 mg/kg Fab'5 anti-cKit-DAR4-C1 (quadrados abertos) infundidos durante três dias e, então, transplantado dois dias depois. Dois animais de controle foram irradiados com 1100 RADS (losangos) um dia antes do transplante e dois animais de controle não foram tratados (losangos abertos) antes do transplante. Os gráficos de linha mostram as células doadoras percentuais (CD45.1+) medidas na população de todas as células (Figura 12A) ou células mieloides (Figura 12B) por análise FACS de amostras de sangue coletadas a cada ponto no tempo. Os dados representam média com erro-padrão.

[0084] **A Figura 13** é uma plotagem de ponto que mostra números relativos de HSCs humanas presentes na medula óssea de camundongos NSG humanizados que seguem o tratamento com vários agentes. Conjugados DAR4 Fab' anti-cKIT depletaram HSCs humanas relativas ao controle de PBS (losangos). Os conjugados anti-cKIT (descritos na Tabela 2) testados foram: JW (círculos); JX (quadrados); JY (triângulos para cima); JZ (triângulos para baixo).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0085] A presente descrição fornece conjugados de fármaco de anticorpo, em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. Aqueles conjugados de fármaco de anticorpo podem entregar seletivamente um agente citotóxico às células que expressam cKIT, por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, ablam seletivamente, assim, aquelas células em um paciente, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética. Preferencialmente, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT têm propriedades farmacocinéticas de modo que o mesmo não estará presente e/ou ativo em uma circulação de paciente por um tempo estendido, de modo que os mesmos possam ser usados para condicionar recipientes de transplante de célula-tronco hematopoiética antes do transplante de célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, são fornecidos no presente documento conjugados que compreendem um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT, ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. De modo surpreendente, os presentes inventores constataram que os anticorpos anti-cKIT de comprimento total (por exemplo, IgGs de comprimento total), fragmentos de F(ab')₂, e conjugados

de toxina dos mesmos causam degranulação de mastócito, mas os conjugados de toxina de Fab' ou Fab anti-cKIT não causam degranulação de mastócito, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores conforme poderia ser observado se um paciente desenvolvesse ou tivesse anticorpos antifármacos pré-existentes que reconhecem fragmentos de Fab. A presente descrição fornece adicionalmente composições farmacêuticas que compreendem os conjugados de fármaco de anticorpo, e métodos de produção e uso de tais composições farmacêuticas para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética.

Definições

[0086] A não ser que determinado de outro modo, os seguintes termos e expressões, conforme usados no presente documento devem ter os seguintes significados:

[0087] O termo "alquila" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto saturado monovalente que tem o número especificado de átomos de carbono. Por exemplo, C₁₋₆ alquila 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.

[0088] O termo "anticorpo", como usado aqui, se relaciona com uma proteína ou sequência polipeptídica derivada de uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a um antígeno. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais, de cadeia múltipla ou simples, ou imunoglobulinas intatas, e podem ser derivados de fontes naturais ou de fontes recombinantes. Um "anticorpo" de ocorrência

natural é uma glicoproteína 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 determinantes da complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que estão mais conservadas, denominadas regiões estrutura principal (FR). Cada VH e VL é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir do terminal amino para o terminal carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 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 efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complementar clássico. Um anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, anticorpo humano, anticorpo humanizado, anticorpo camelídeo ou anticorpo quimérico. Os anticorpos podem ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse.

[0089] "Domínios determinantes de complementaridade" ou "regiões determinantes de complementaridade" ("CDRs") referem-se de forma intercambiável às regiões hipervariáveis de VL e VH. As CDRs são o sítio de ligação a proteína-alvo das cadeias de anticorpo que

abrigam especificidade para tal proteína-alvo. Há três CDRs (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 CDRs podem ser denominadas por sua região ou ordem. Por exemplo, tanto "VHCDR1" quanto "HCDR1" referem-se à primeira CDR da região variável de cadeia pesada. As CDRs são estruturalmente complementares ao epítipo da proteína-alvo e são, assim, diretamente responsáveis pela especificidade de ligação. Os prolongamentos restantes da VL ou VH, as assim chamadas regiões de estrutura principal, exibem menos variação em sequência de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4ª edição, Capítulo 4, W.H. Freeman & Co., Nova Iorque, 2000).

[0090] As fronteiras precisas de sequências de aminoácidos de uma dada CDR podem ser determinadas usando qualquer um de alguns esquemas bem conhecidos, incluindo os descritos por Kabat *et al.* (1991), "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeração de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273, 927-948 (esquema de numeração de "Chothia") e numeração de ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132 a 136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev.. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (esquema de numeração de "IMGT"). Por exemplo, para formatos clássicos, sob Kabat, os resíduos de aminoácidos de CDR no domínio variável de cadeia pesada (VH) são numerados 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) e 95-102 (HCDR3); os resíduos de aminoácidos de CDR no domínio variável de cadeia leve (VL) são numerados 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) e 89-97 (LCDR3). Sob Chothia, os aminoácidos de CDR no VH são numerados 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) e 95-102 (HCDR3); os aminoácidos em VL são numerados 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) e 91-96 (LCDR3). Por combinação das defi-

nições de CDR de tanto Kabat como Chothia, as CDRs consistem nos resíduos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) e 95-102 (HCDR3) em VH humano e resíduos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) e 89-97 (LCDR3) em VL humano. Sob IMGT, os resíduos de aminoácidos de CDR no VH são numerados aproximadamente 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) e 93-102 (CDR3), e os resíduos de aminoácidos de CDR no VL são numerados aproximadamente 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) e 89-97 (CDR3) (numerado de acordo com "Kabat"). Sob IMGT, as regiões de CDR de um anticorpo podem ser determinadas com o uso do programa IMGT/DomainGap Align.

[0091] 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 reconhecido 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 e, em alguns casos, CH4) conferem propriedades biológicas importantes, tal como secreção, mobilidade transplacentária, ligação a receptor Fc, ligação a complemento, ligação a receptor FcRn, meia-vida, farmacocinética e similares. Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta conforme se tornam mais distais do sítio de ligação a antígeno ou terminal amino do anticorpo. O terminal N é uma região variável e o terminal C é uma região constante; os domínios CH3 e CL realmente compreendem os domínios carbóxi-terminais da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[0092] O termo "fragmento de anticorpo" ou "fragmento de ligação a 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 esté-

rico, estabilização/desestabilização, distribuição espacial) um epítopo de um antígeno (por exemplo, cKIT). Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, porém sem limitação, um fragmento Fab, que é um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento Fab', que é um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL, CH1, e uma região de dobradiça; um fragmento F(ab')₂, que é um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; um meio anticorpo, que inclui includes uma cadeia pesada única e uma cadeia leve única ligadas por uma ponte de dissulfeto; um anticorpo de um braço, que inclui um fragmento Fab ligado a uma região Fc; um anticorpo com deleção de domínio CH2, que inclui dois fragmentos de Fab ligados aos dímeros de domínio CH3 (consultar Glaser, J Biol Chem. 2005; 280(50):41494 a 503); um Fv de cadeia única (scFv); um Fv ligado a dissulfeto (sdFv); um fragmento de Fd que consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento de Fv que consiste nos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo; um fragmento de dAb (Ward *et al.*, Nature 341:544 a 546, 1989), que consiste em um domínio VH; e uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou outros fragmentos de ligação a epítopo de um anticorpo. Por exemplo, um fragmento Fab pode incluir resíduos de aminoácidos 1 a 222 (numeração de EU) da cadeia pesada de um anticorpo; enquanto um fragmento Fab' pode incluir resíduos de aminoácidos 1 a 236 (numeração de EU) da cadeia pesada de um anticorpo. O fragmento Fab ou Fab' de um anticorpo pode ser gerado recombinantemente ou por digestão enzimática de um anticorpo original. Fab ou Fab' gerados recombinantemente podem ser geneticamente modificados para introduzir aminoácidos para conjugação específica para sítio, tais como cisteínas (Junutula, J. R.; et al., Nature biotechnology 2008, 26, 925), pirrolina-carbóxi-lisinas (Ou, W. et al., Proc Natl Acad

Sci USA 2011;108(26):10.437 a 10.442) ou aminoácidos não naturais (por exemplo, Tian, F. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2014, 111, 1.766, Axup, J. Y. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2012, 109, 16101). Similarmemente, mutações ou etiquetas peptídicas podem ser adicionadas para facilitar a conjugação através de fosfopanteteína transferases (Grunewald, J. et al., Bioconjugate chemistry 2015, 26, 2.554), enzima formadora de formil glicina (Drake, P. M. et al., Bioconjugate chemistry 2014, 25, 1.331), transglutaminase (Strop, P. et al., *Chemistry & biology* 2013, 20, 161), sortase (Beerli, R. R.; Hell, T.; Merkel, A. S.; Grawunder, U. *PloS one* 2015, 10, e0131177) ou outras estratégias de conjugação enzimática. 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: 5.879 a 5.883, 1988). Tais anticorpos de cadeia única se destinam também a serem abrangidos pelo termo "fragmento de ligação a antígeno". Estes fragmentos de ligação a 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.

[0093] Fragmentos de anticorpo ou fragmentos de ligação a antígeno também podem ser incorporados em anticorpos de domínio único, maxicorpos, minicorpos, nanocorpos, 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 antígeno podem ser enxertados em moldes baseados em polipeptídeos como uma fibronectina tipo III (Fn3) (ver patente nº U.S.

6.703.199, que descreve monocorpos polipeptídicos de fibronectina).

[0094] Fragmentos de anticorpo ou fragmentos de ligação a 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 a antígeno (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8:1.057 a 1.062, 1995; e Patente nº U.S. 5.641.870).

[0095] O termo "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usado no presente documento, refere-se a polipeptídeos, incluindo anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno que têm sequência de aminoácidos substancialmente idêntica ou são derivados da mesma fonte genética. Este 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 por um epítipo particular.

[0096] O termo "anticorpo humano", conforme usado no presente documento, inclui anticorpos que têm regiões variáveis em que tanto as regiões de estrutura principal 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 estrutura principal consenso derivadas da análise de sequências de estrutura principal humanas, por exemplo, conforme descrito em Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57 a 86, 2000.

[0097] Os anticorpos humanos da presente descrição podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica para sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*, ou uma

substituição conservadora para promover estabilidade e fabricação).

[0098] O termo "reconhecer", conforme usado no presente documento, refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que encontra e interage (por exemplo, se liga) com seu epítopo, quer esse epítopo seja linear ou conformacional. O termo "epítopo" refere-se a um sítio em um antígeno que um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da descrição se liga especificamente. Os epítopos podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos quanto aminoácidos não contíguos justapostos por enovelamento terciário de uma proteína. Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos em exposição para desnaturar solventes, enquanto os epítopos formados por enovelamento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo 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 epítopos incluem técnicas na técnica, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional (consultar, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Volume 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Um "parátopo" é a parte do anticorpo que reconhece o epítopo do antígeno.

[0099] A expressão "se liga especificamente" ou "se liga seletivamente," quando usada 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 um aspecto, 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 quanto a sua especificidade para uma proteína particular. Conforme desejado ou adequado, essa seleção pode ser atingida subtraindo-se anticorpos que sofrem reação cruzada com moléculas de outras espécies (por exemplo, camundongo ou rato) ou outros subtipos. Alternativamente, em alguns aspectos, são selecionados anticorpos ou fragmentos de anticorpo que sofrem reação cruzada com certas moléculas desejadas.

[00100] 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 fracas com antígeno em diversos sítios; quanto mais interações, mais forte a afinidade.

[00101] 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.

[00102] O termo "sequência de linhagem germinativa humana cor-

respondente" 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. As sequências de linhagem germinativa humana correspondentes podem ser regiões de estrutura principal apenas, regiões determinantes de complementaridade apenas, regiões de estrutura principal e determinantes de complementaridade, um segmento variável (conforme definido acima) ou outras combinações de sequências ou subsequências que compreendem uma região variável. A identidade de sequência pode ser determinada com o uso dos métodos descritos no presente documento, por exemplo, alinhando-se duas sequências com o uso de BLAST, ALIGN ou outro algoritmo de alinhamento conhecido na técnica. A sequência de ácidos nucleicos ou aminoácidos de linhagem 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.

[00103] Uma variedade de formatos de imunoensaio pode ser usada 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 (consultar, por exemplo, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para uma descrição de formatos e condições de imunoensaio que podem ser usados para determinar a imunoreatividade 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.

[00104] O termo "constante de dissociação em equilíbrio (KD [M])" refere-se à constante de taxa de dissociação (k_d [s^{-1}]) dividida pela constante de taxa de associação (k_a [s^{-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 descrição, de modo geral, terão uma constante de dissociação em equilíbrio menor do que cerca de 10^{-7} ou 10^{-8} M, por exemplo, menor do que cerca de 10^{-9} M ou 10^{-10} M, em alguns aspectos, menor do que cerca de 10^{-11} M, 10^{-12} M ou 10^{-13} M.

[00105] 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.

[00106] Conforme usado no presente documento, a expressão "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 alguns aspectos, 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 presente descrição. Em alguns aspectos, a expressão "que consiste essencialmente em" exclui expressamente a inclusão de um ou mais agentes ativos adicionais além de conjugado de anticorpo e fármaco de uma presente descrição e um segundo agente coadministrado.

[00107] 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-fosfoserina. 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, homoserina, 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 que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funciona de uma maneira similar a um aminoácido de ocorrência natural.

[00108] O termo "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 degenerescên-

cia do código genético, um número grande de ácidos nucleicos funcionalmente idênticas codifica qualquer dada proteína. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU todos 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 cada variação silenciosa possível 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.

[00109] 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 conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Tais variantes conservativamente modificadas são adicionais a e não excluem variantes polimórficas, homólogos entre espécies e alelos. Os oito grupos seguintes contêm aminoácidos que são substituições conservativas por um outro: 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) (consultar, por exemplo, Creighton, Proteins (1984)). Em alguns aspectos, o termo "modificações conservativas de sequências" é usado para referência a modificações de aminoácidos que não afetam nem alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo a sequência de aminoácidos.

[00110] O termo "otimizado" conforme usado no presente documento refere-se a uma sequência de nucleotídeos que foi alterada para codificar uma sequência de aminoácidos com o uso de 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 "original".

[00111] Os termos "porcentagem de identidade" ou "identidade percentual", no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, referem-se até ao ponto em que duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais. Duas sequências são "idênticas" se tiverem a mesma sequência de aminoácidos ou nucleotídeos sobre a região que é comparada. Duas sequências são "substancialmente idênticas" se duas sequências tiverem uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são iguais (isto é, 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, medida usando um dos seguintes algoritmos de comparação de se-

quências 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.

[00112] Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência funciona como sequência de referência com a qual as 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 então calcula a porcentagem de identidades de sequências para as sequências de teste relativamente à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa.

[00113] 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 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, BEST-FIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por alinhamento manual e inspeção visual (consultar, por exemplo, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

[00114] Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a porcentagem de identidade 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 alta semelhança (HSPs) identificando-se palavras pequenas de comprimento W na sequência de consulta, que se correlacionam ou satisfazem alguma pontuação limite com valor positivo T 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 vizinhança (Altschul *et al.*, supra). Esses acertos de palavra de vizinhança inicial atuam como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo os mesmos. Os acertos de palavra são estendidos em ambas as direções ao longo de cada sequência por tanto quanto a pontuação de alinhamento acumulativo possa ser aumentada. As pontuações acumulativas são calculadas com o uso, para sequências de nucleotídeos, dos parâmetros M (pontuação de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre > 0) e N (pontuação de penalidade para resíduos não correspondentes; sempre < 0). Para sequências de aminoácidos, uma matriz de pontuação é usada para calcular a pontuação acumulativa. A extensão de acertos de palavra em

cada direção é interrompida quando: a pontuação de alinhamento acumulativa cai em uma quantidade X a partir de seu valor máximo atingido; a pontuação acumulativa chega a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo com pontuação negativa; ou a extremidade de qualquer sequência é atingida. 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 das 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.

[00115] 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 ao 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.

[00116] 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 pesos 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 com o uso do 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), com o uso de uma matriz Blossom 62 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.

[00117] Além da porcentagem de identidade de sequência indicada acima, outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos são substancialmente idênticos 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 conservativas. Outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que as duas moléculas e seus complementos se hibridizam uns aos outros sob condições estridentes, conforme descrito abaixo. Ainda outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que os mesmos iniciadores podem ser usados para amplificar a sequência.

[00118] O termo "ácido nucleico" é usado no presente documento de forma intercambiável com o termo "polinucleotídeo" e refere-se a desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros dos mesmos na forma com fita simples ou dupla. O termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos de nucleotídeo conhecidos ou resíduos ou ligações de cadeia principal modificados, que são sintéticos, de ocorrência na-

tural 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. Os exemplos de tais análogos incluem, sem limite, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metila, fosfonatos de metila quiral, 2-O-metil ribonucleotídeos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

[00119] 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 (Batzner *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).

[00120] O termo "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 entre uma sequência reguladora transcricional e uma sequência transcrita. Por exemplo, uma sequência promotora 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 contí-

guas ou localizadas em estreita proximidade com as sequências de codificação cuja transcrição intensificam.

[00121] Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável no presente documento para referência a 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 conservativamente modificadas da mesma.

[00122] O termo "conjugado" ou "conjugado de anticorpo e fármaco", conforme usado no presente documento, refere-se à ligação de um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo com outro agente, tal como um agente quimioterápico, uma toxina, um agente imunoterapêutico, uma sonda de imagiologia e similares. As ligações 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. Adicionalmente, o conjugado pode ser fornecido na forma de uma proteína de fusão que pode ser expressa a partir de um polinucleotídeo que codifica o conjugado. 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.

[00123] O termo "sujeito" inclui ser humano 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 no presente documento de forma intercambiável.

[00124] O termo "toxina", "citotoxina" ou "agente citotóxico", conforme usado no presente documento, refere-se a qualquer agente que é prejudicial ao crescimento e proliferação de células e pode atuar para reduzir, inibir ou destruir uma célula ou malignidade.

[00125] O termo "agente anticâncer", conforme usado no presente documento, refere-se a qualquer agente que pode ser usado para tratar um distúrbio de proliferação celular, tal como câncer, incluindo, porém sem limitação, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, radioterapia e agentes radioterápicos, agentes anticâncer alvejados e agentes imunoterápicos.

[00126] O termo "porção química de fármaco" ou "carga útil", conforme usado no presente documento, refere-se a uma porção química que é conjugada a um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e pode incluir qualquer agente terapêutico ou diagnóstico, por exemplo, um anticâncer, anti-inflamatório, anti-infeccioso (por exemplo, antifúngico, antibacteriano, antiparasítico, antiviral) ou um agente anestésico. Em certos aspectos, uma porção química de fármaco é selecionada dentre um inibidor de Eg5, 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 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 proteassoma, um inibidor de quinesina, um inibidor de HDAC, um agente de da-

nificação de DNA, um agente alquilante de DNA, um intercalador de DNA, um aglutinante de sulco menor de DNA, um inibidor de RNA polimerase, uma amanitina, um inibidor de espliceossomo, um inibidor de topoisomerase e um inibidor de DHFR. Os métodos para fixar cada um dos mesmos a um ligante compatível com os anticorpos e o método da presente descrição são conhecidos na técnica. Consultar, 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 infravermelha, uma sonda de afinidade, um quelador, uma sonda espectroscópica, uma sonda radioativa, uma molécula de lipídio, um polietilenoglicol, 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.

[00127] O termo "câncer" inclui tumores malignos primários (por exemplo, aqueles cujas células não migraram para sítios no corpo do sujeito diferentes daquele sítio do tumor original) e tumores malignos secundários (por exemplo, aqueles que surgem a partir de metástase, a migração de células tumorais a sítios secundários que são diferentes do sítio do tumor original).

[00128] O termo "cKIT" (também conhecido como KIT, PBT, SCFR, C-Kit, CD117) refere-se a um receptor de tirosina quinase que é um membro da família de tirosina quinase receptora III. As sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos de isoformas de cKIT humano são conhecidas e foram publicadas no GenBank com os seguintes números de acesso:

NM_000222.2 → NP_000213.1 Precursor de isoforma 1 de Kit de receptor de fator de crescimento de mastócito/célula-tronco;

NM_001093772.1 → NP_001087241.1 Precursor de isoforma 2 de Kit de receptor de fator de crescimento de mastócito/célula-tronco.

[00129] Estruturalmente, o receptor de cKIT é uma proteína transmembranar do tipo I e contém um peptídeo de sinalização, 5 domínios C2 do tipo Ig no domínio extracelular e tem um domínio de proteína quinase em seu domínio intracelular. Conforme usado no presente documento, o termo "cKIT" é usado para se referir coletivamente a todas as isoformas de ocorrência natural de proteína cKIT ou uma variante da mesma.

[00130] O termo "variante" refere-se a um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica a um polipeptídeo de referência ou 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 identidade de sequência mais alta com um polipeptídeo de referência, enquanto mantém uma ou mais atividades do polipeptídeo de referência.

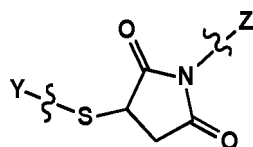
[00131] Como aqui utilizado, os termos "tratar", "que trata" ou "tratamento" de qualquer doença ou distúrbio referem-se, em um aspecto, a melhorar a doença ou distúrbio (isto é, retardar ou parar ou reduzir o desenvolvimento da doença ou pelo menos um dos seus sintomas clínicos). Em outro aspecto, "tratar", "que trata" ou "tratamento" referem-se a aliviar ou melhorar pelo menos um parâmetro físico, incluindo aqueles que podem não ser discerníveis pelo paciente. Em ainda outro aspecto, "tratar", "que trata" ou "tratamento" se referem 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. Em ainda outro aspecto, "tratar", "tratando" ou "tratamento" referem-se a prevenir ou retardar o início ou desenvolvimento ou progressão da doença ou distúrbio.

[00132] O termo "quantidade terapeuticamente aceitável" ou "dose

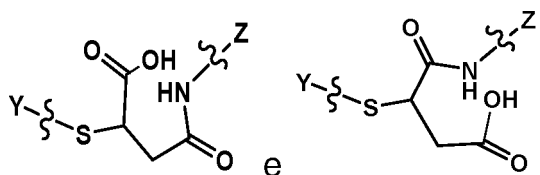
terapeuticamente eficaz" se refere de forma intercambiável a uma quantidade suficiente para efetuar o resultado desejado (isto é, uma redução em tamanho de tumor, inibição de crescimento de tumor, prevenção de metástase, inibição ou prevenção de infecção viral, bacteriana, fúngica ou parasítica). Em alguns aspectos, uma quantidade terapêuticamente aceitável não induz ou causa efeitos colaterais indesejáveis. Uma quantidade terapêuticamente aceitável pode ser determinada administrando-se primeiramente uma dose baixa e, então, aumentando-se incrementalmente essa dose até o efeito desejado ser atingido. Uma "dosagem terapêuticamente eficaz" das moléculas da presente descrição pode impedir o início de ou resultar em uma diminuição em gravidade, respectivamente, de sintomas da doença, incluindo sintomas associados a câncer.

[00133] O termo "coadministra" refere-se à presença simultânea de dois agentes ativos no sangue de um indivíduo. Os agentes ativos que são coadministrados podem ser simultânea ou sequencialmente liberados.

[00134] O termo "tiol-maleimida", conforme usado no presente documento, refere-se a um grupo formado por reação de um tiol com maleimida, que tem sua fórmula geral:



[00135] em que Y e Z são grupos a serem conectados por meio da ligação de tiol-maleimida e podem compreender componentes ligantes, anticorpos ou cargas úteis. A tiol-maleimida pode formar as seguintes estruturas abertas de anel



[00136] "Passível de clivagem", conforme usado no presente documento, refere-se a um grupo de ligação ou componente ligante que conecta duas porções químicas por conexões covalentes, mas quebra para quebrar a conexão covalente entre as porções químicas sob condições fisiologicamente relevantes, tipicamente um grupo de ligação passível de clivagem é quebrado *in vivo* mais rapidamente em um ambiente intracelular do que quando fora de uma célula, fazendo com que a liberação da carga útil ocorra de preferência dentro de uma célula alvejada. A clivagem pode ser enzimática ou não enzimática, mas, de modo geral, libera uma carga útil de um anticorpo sem degradar o anticorpo. A clivagem pode deixar alguma porção de um grupo de ligação ou componente ligante fixada à carga útil ou pode liberar a carga útil sem qualquer resíduo do grupo de ligação.

[00137] "Não passível de clivagem", conforme usado no presente documento, refere-se a um grupo de ligação ou componente ligante que não é especialmente suscetível a quebrar sob condições fisiológicas, por exemplo, é pelo menos tão estável quanto a porção de anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do conjugado. Tais grupos de ligação são algumas vezes denominados "estáveis", o que significa que são suficientemente resistentes à degradação para manter a carga útil conectada ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno até o próprio anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno ser pelo menos parcialmente degradado, isto é, a degradação do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno precede a clivagem do grupo de ligação *in vivo*. A degradação da porção de anticorpo de um ADC que tem um grupo de ligação estável ou não passível de clivagem pode deixar parte ou todo o grupo de ligação, por exemplo, um ou mais grupos aminoácidos de um anticorpo, fixado à carga útil ou porção química de fármaco que é entregue *in vivo*.

Porção Química de Ligante-Fármaco ($L_B-(D)_n$)

[00138] Em um aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina, uma amanitina, um maitansinoide e uma saporina.

[00139] Em outro aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina e uma amanitina.

[00140] Em um aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que o ligante (L_B) é um ligante passível de clivagem e a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina, uma amanitina, um maitansinoide e uma saporina.

[00141] Em outro aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que o ligante (L_B) é um ligante passível de clivagem e a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina e uma amanitina.

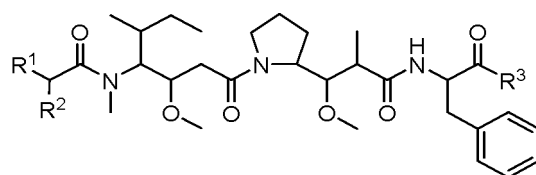
[00142] Em um aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que o ligante (L_B) é um ligante não passível de clivagem e a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina, uma amanitina, um maitansinoide e uma saporina.

[00143] Em outro aspecto, a porção química de Fármaco (D) é uma toxina proteica selecionada dentre saporina, proteína antiviral de tintureira (PAP), briodina 1, bouganina, gelonina, ricina, abrina, lectina de visco, modicina, volkensina, asparina, momordina, ebulina, viscumina,

toxina Shiga, toxina de difteria (DT) ou exotoxina de *Pseudomonas* (PE). Tais toxinas proteicas têm capacidade de eliminar células inativando ribossomos ou inibindo a síntese de proteína por interferência com a função de fator de alongamento 2 (EF2) (consultar Kreitman et al., Immunotoxins for targeted cancer therapy, The AAPS Journal 2006; 8 (3) Article 63; Gadadhar e Karande, Targeted Cancer Therapy: History and Development of Immunotoxins, Capítulo 1 de Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy, páginas 1 a 31). Em algumas modalidades, a toxina proteica é saporina. Tal toxina proteica pode ser covalentemente fixada a um ligante passível de clivagem ou não passível de clivagem (L_B).

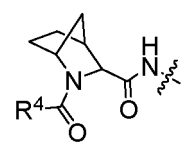
[00144] Em outro aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção compreende uma ou mais citotoxinas fixadas covalentemente a um ligante (L_B), em que o ligante (L_B) é um ligante não passível de clivagem e a uma ou mais citotoxinas são independentemente selecionadas dentre uma auristatina ou uma amanitina.

[00145] Em um aspecto a porção química de Ligante-Fármaco da invenção é um composto que tem uma estrutura de Fórmula (A), ou estereoisômeros ou sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo,

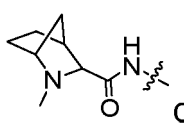
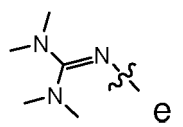


Fórmula (A)

[00146] em que:

[00147] R^1 é  e R^3 é -OH;

[00148] ou

[00149] R^1 é  ou  e R^3 é $-L_5R^{14}$;

[00150] R^2 é C_1 - C_6 alquila;

[00151] R^4 é $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$, $-L_2R^{34}$ ou $-L_3R^{44}$;

[00152] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_m^-$,
 $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$, $-((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mC(R_7)_2^-$,
 $-(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$ ou
 $-(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

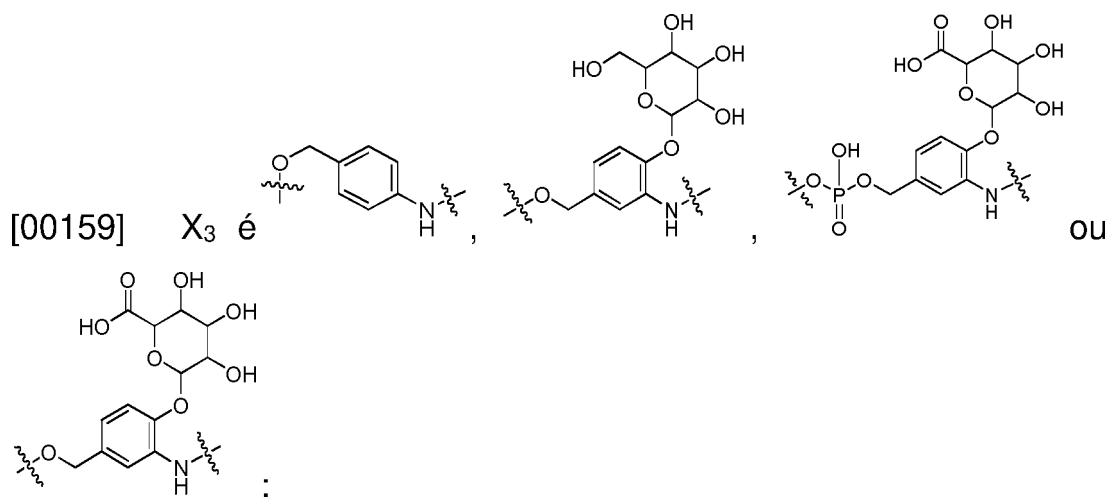
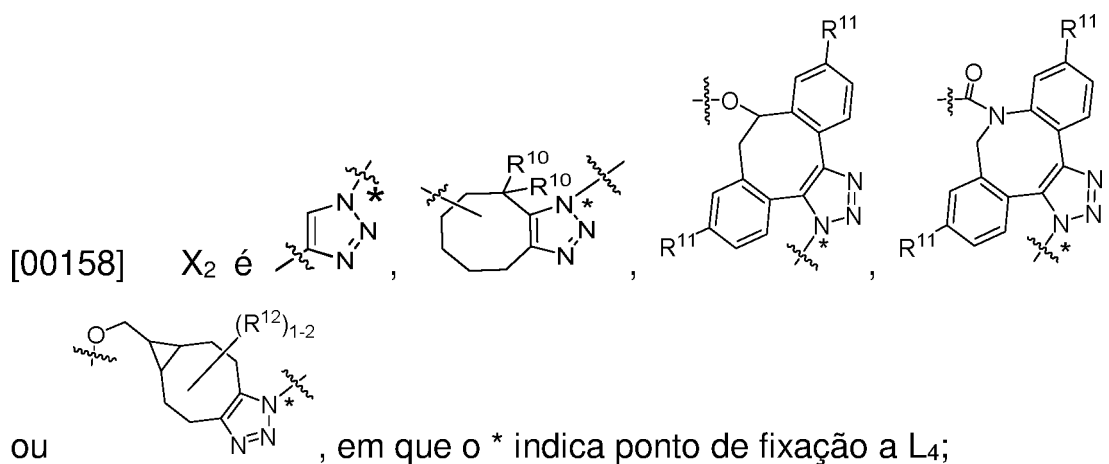
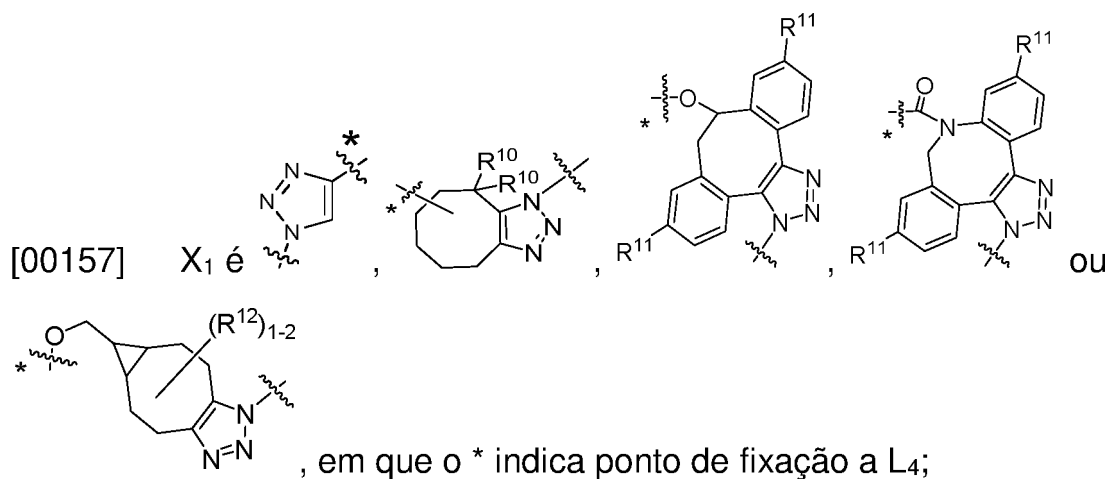
[00153] L_2 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_m^-$,
 $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$, $-((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mC(R_7)_2^-$,
 $-(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$ ou
 $-(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

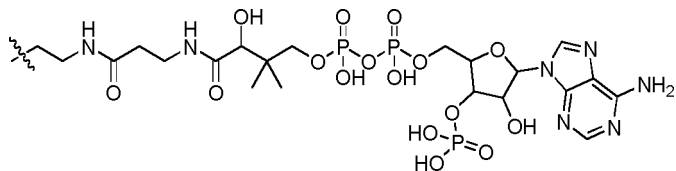
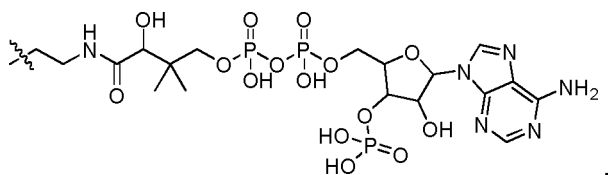
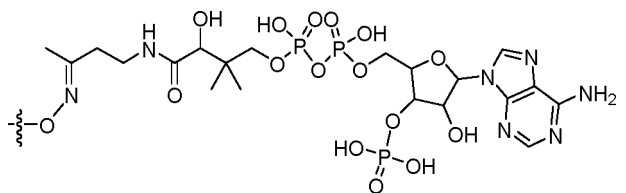
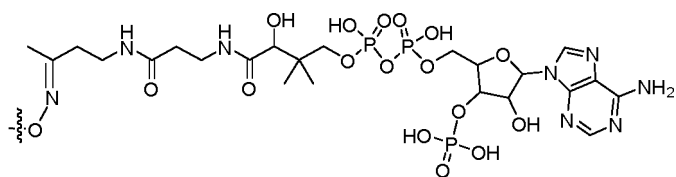
[00154] L_3 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_m^-$,
 $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$, $-((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mC(R_7)_2^-$,
 $-(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$ ou
 $-(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

[00155] L_4 é $-(CH_2)_m^-$;

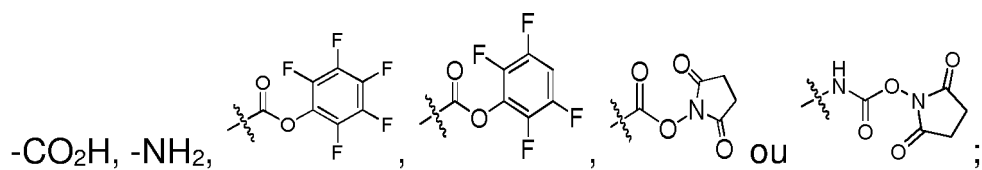
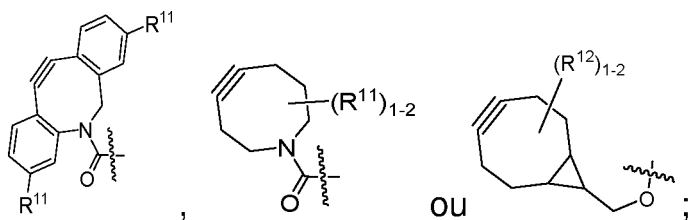
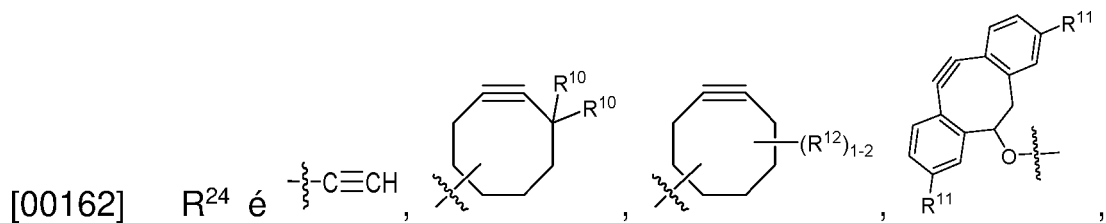
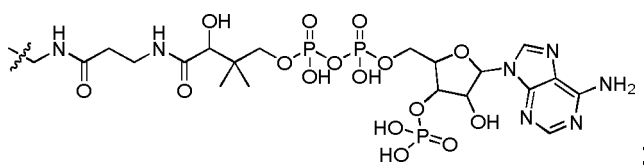
[00156] L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-NH(CH_2)_m^-$,

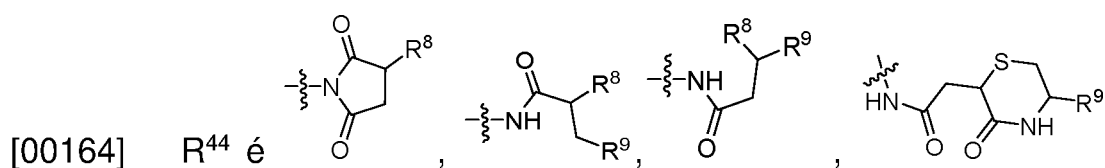
$-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$,
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$,
 $-\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$,
 $-\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}_7)_2-$,
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}_7)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$ ou
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{X}_3\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m-$;





ou





ou $-NR^7C(=O)CH_2R^8$;

[00165] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00166] R^8 é $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

[00167] R^9 é $-C(=O)OR^7$;

[00168] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e $-OH$;

[00169] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e $-OH$;

[00170] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00171] R^{13} é 2-piridila ou 4-piridila;

[00172] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00173] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00174] Em outro aspecto a porção química de Ligante-Fármaco da invenção é um composto que tem uma estrutura de Fórmula (B), ou estereoisômeros ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo,

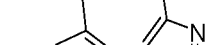
Fórmula (B)

[00182] L₈ é -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻,
-L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -L₄NHC(=O)NH
((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_m⁻,
-(CH₂)_mX₁(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻,
-(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,

-((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m, -((CH₂)_mO)_pCH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-,
 -(CH₂)_mC(R₇)₂- ou -(CH₂)_mC(R₇)₂SS(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m-;
 [00183] L₄ é -(CH₂)_m-;

[00184] X_1 é

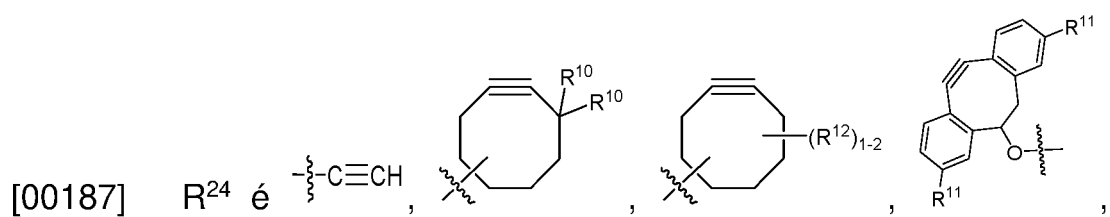
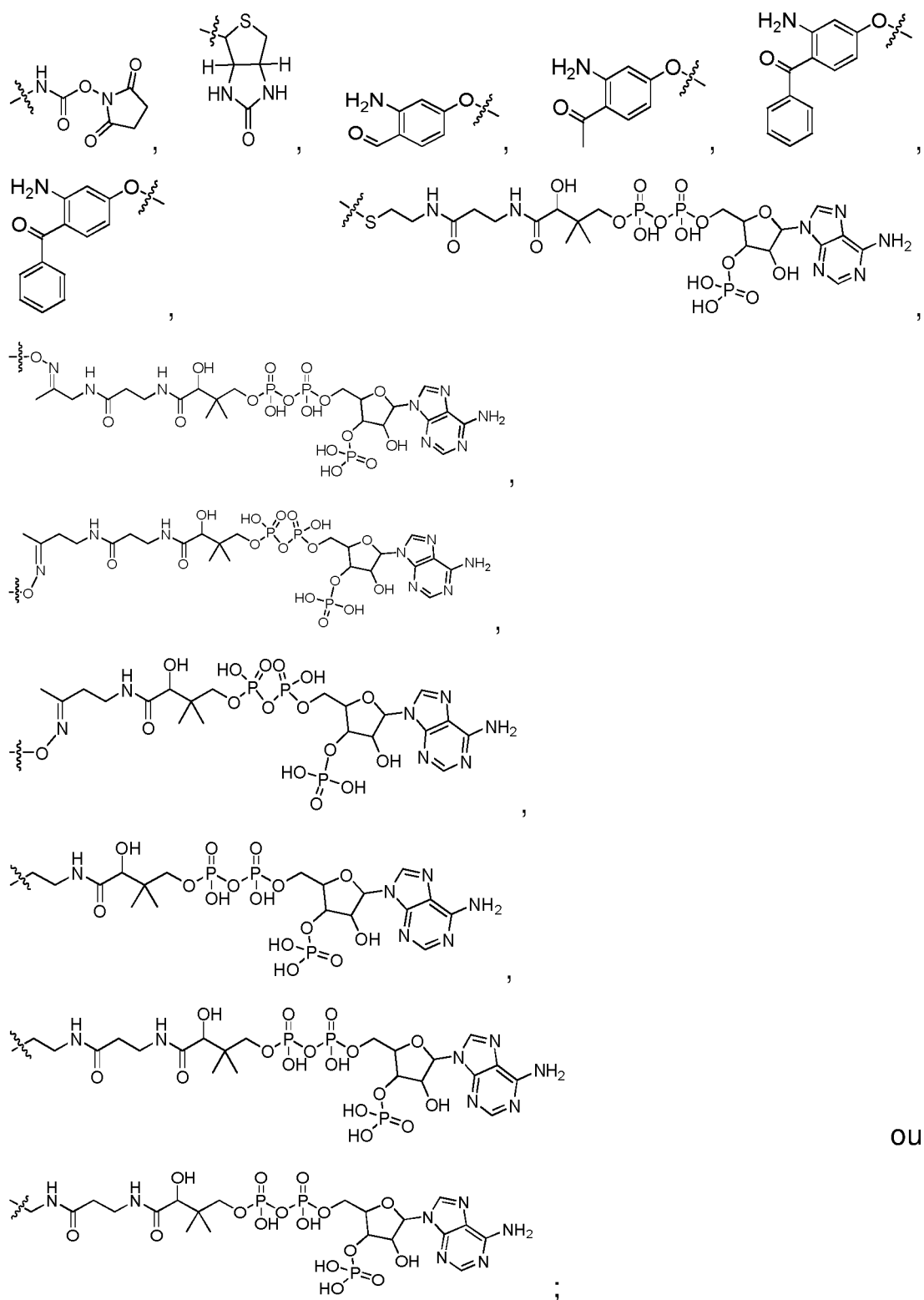
, em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

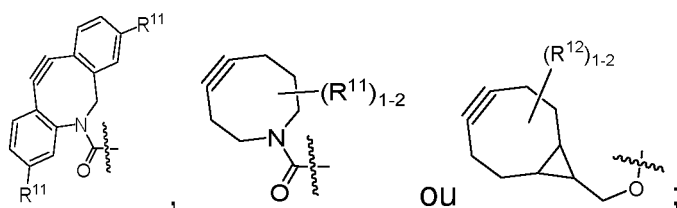
[00185] X_2 é , , , ,

ou ,

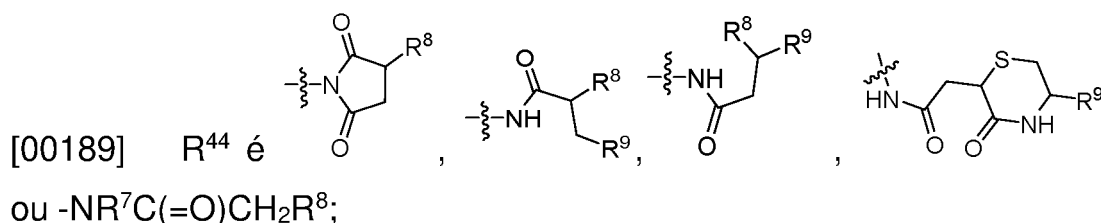
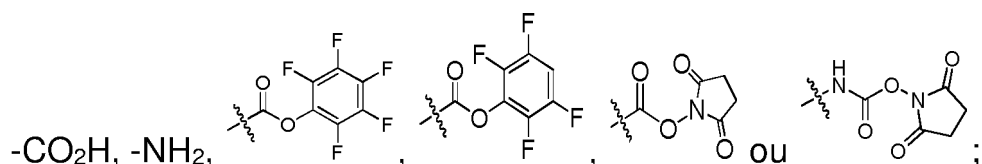
em que o * indica ponto de fixação a L4;

[00186] R¹⁴ é , -N₃, -ONH₂, -NR⁷C(=O)CH=CH₂, SH, -SSR¹³, -S(=O)₂(CH=CH₂), -NR⁷S(=O)₂(CH=CH₂), -NR⁷C(=O)CH₂Br, -NR⁷C(=O)CH₂I, -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(=O)NHNH₂,





[00188] R^{34} é, $-N_3$, $-ONH_2$, $-NR^7C(=O)CH=CH_2$, $-C(=O)NHNH_2$,



[00190] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00191] R^8 é $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

[00192] R^9 é $-C(=O)OR^7$;

[00193] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e $-OH$;

[00194] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e $-OH$;

[00195] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_1 - C_4 alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_1 - C_4 alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00196] R^{13} é 2-piridila ou 4-piridila;

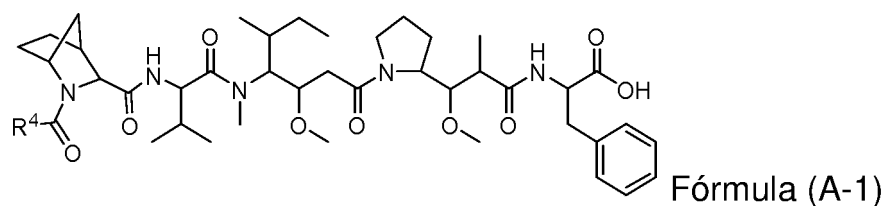
[00197] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00198] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00199] Determinados aspectos e exemplos da porção química de Ligante-Fármaco da invenção são fornecidos na seguinte listagem de

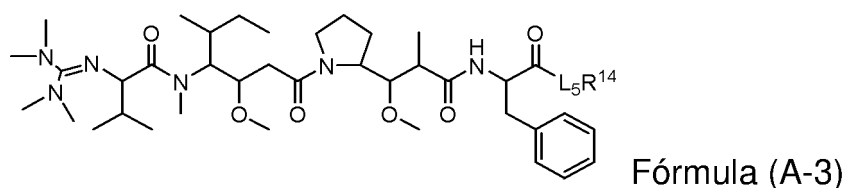
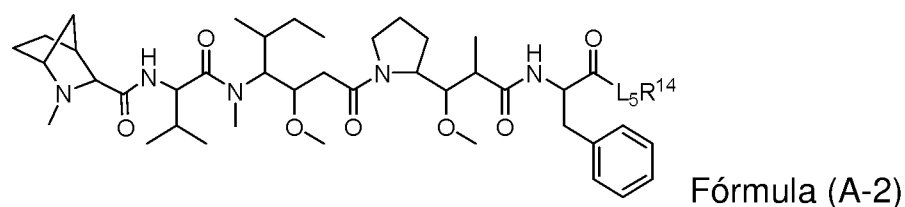
modalidades adicionais enumeradas. Será reconhecido que os recursos especificados em cada modalidade podem ser combinados com outros recursos especificados para fornecer modalidades adicionais da presente invenção.

[00200] Modalidade 1. O composto de Fórmula (A), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fórmula (A-1), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:



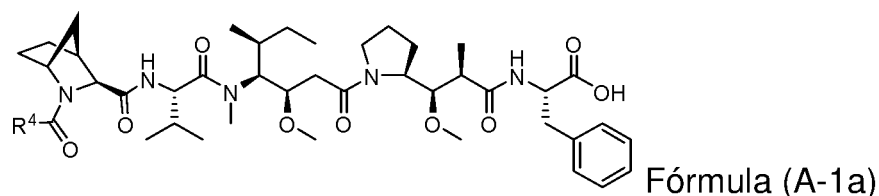
[00201] em que: R⁴ é conforme definido acima.

[00202] Modalidade 2. O composto de Fórmula (A), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fórmula (A-2) ou Fórmula (A-3), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:



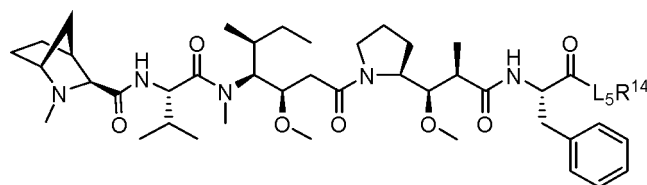
[00203] em que: L₅ e R¹⁴ são conforme definidos acima.

[00204] Modalidade 3. O composto de Fórmula (A), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fórmula (A-1a), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:

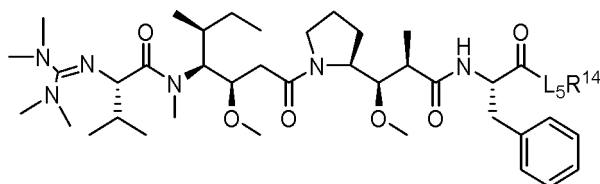


[00205] em que: R^4 é conforme definido acima.

[00206] Modalidade 4. O composto de Fórmula (A), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fórmula (A-2a) ou Fórmula (A-3a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula (A-2a)



Fórmula (A-3a)

[00207] em que: L_5 e R^{14} são conforme definidos acima.

[00208] Modalidade 5. O composto de Fórmula (A), Fórmula (A-1) ou Fórmula (A-1a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

[00209] em que:

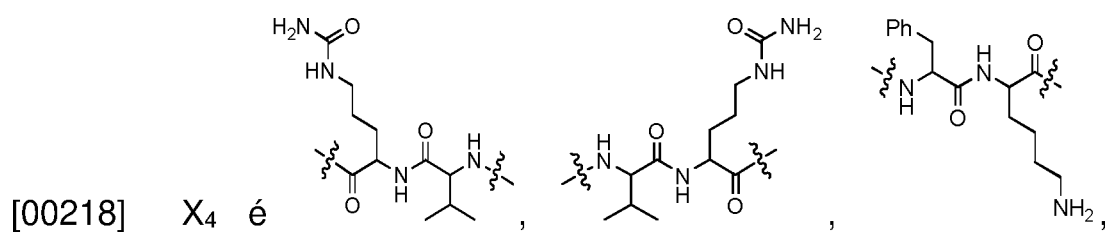
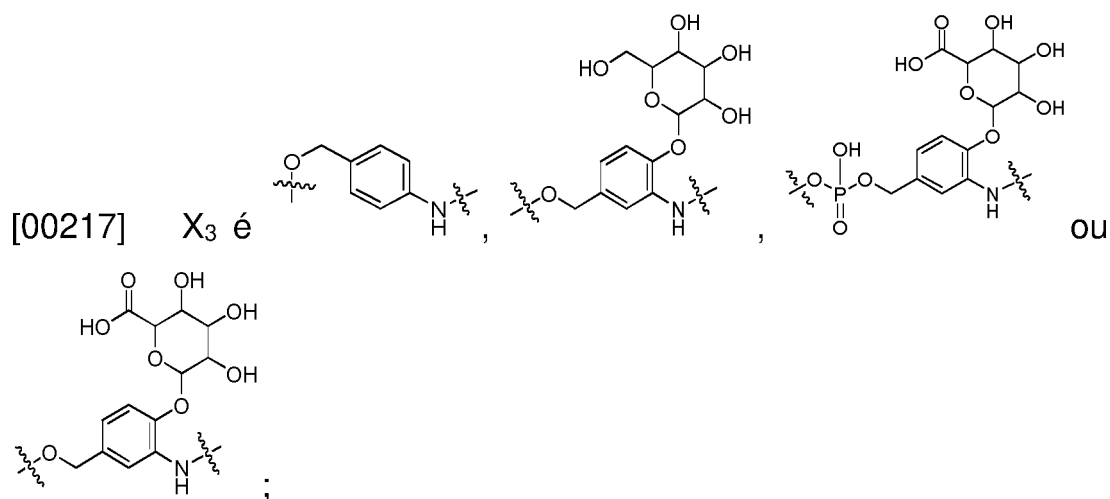
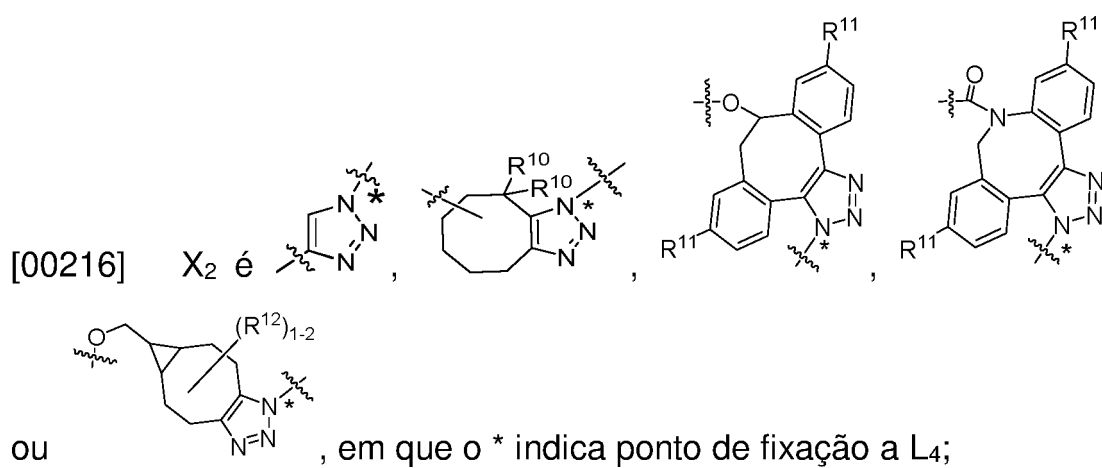
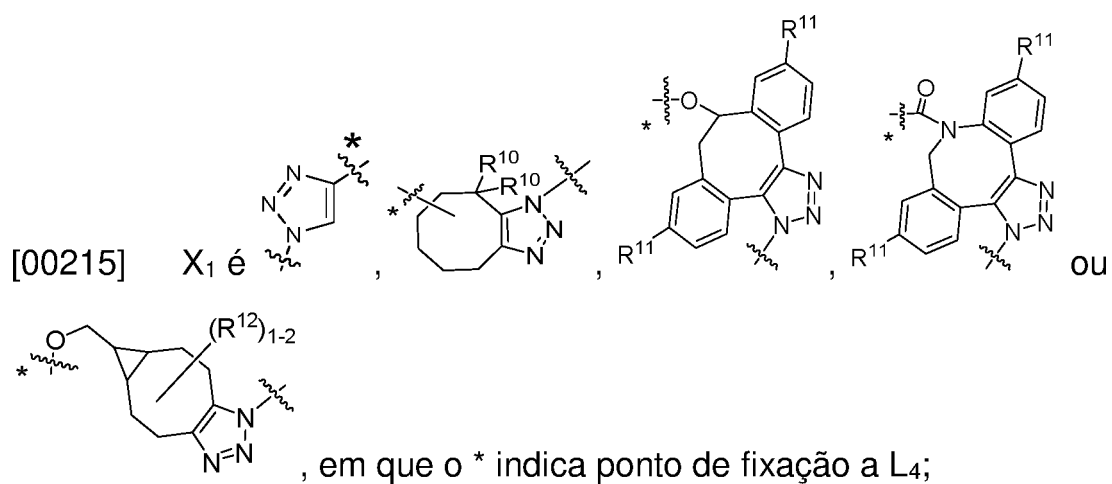
[00210] R^4 é $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$, $-L_2R^{34}$ ou $-L_3R^{44}$;

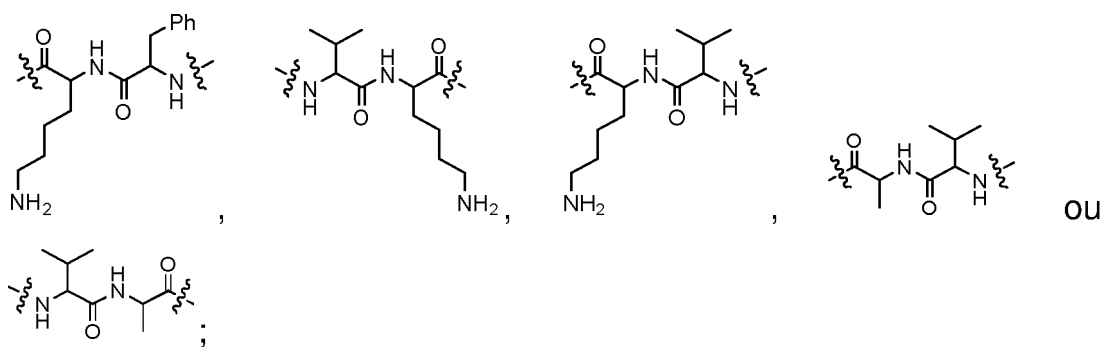
[00211] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

[00212] L_2 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

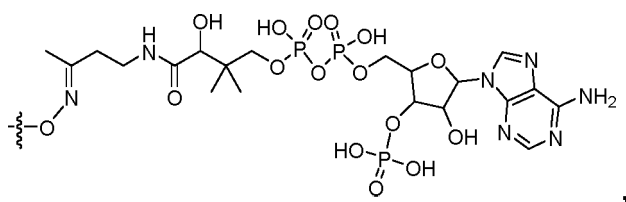
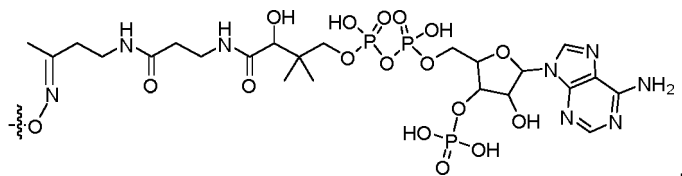
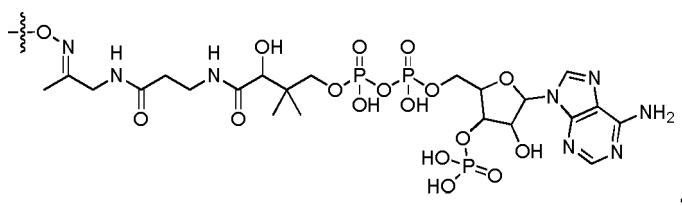
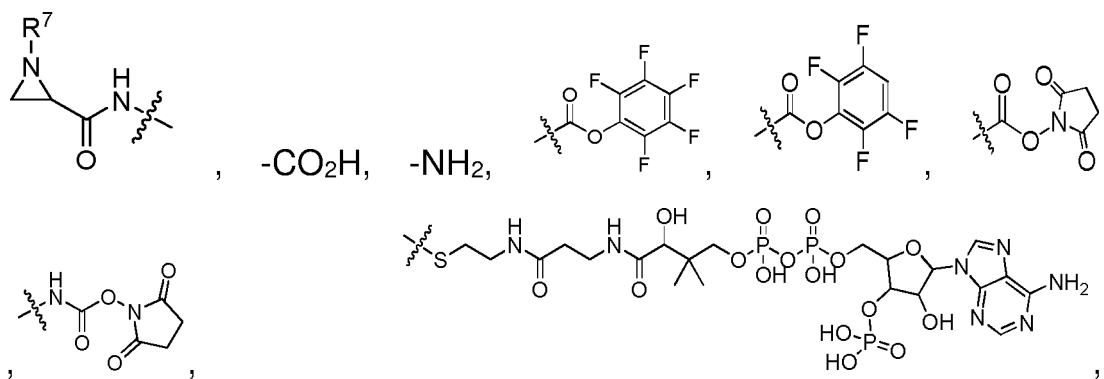
[00213] L_3 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

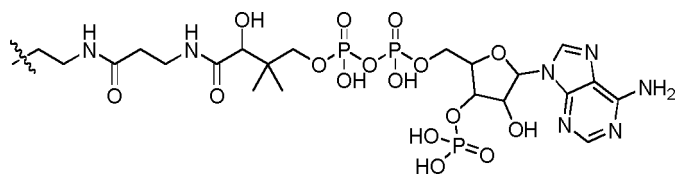
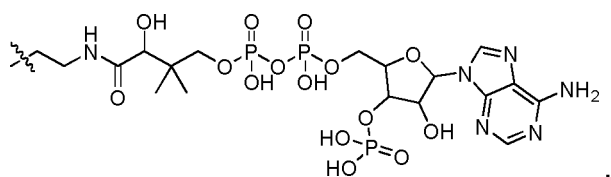
[00214] L_4 é $-(CH_2)_m^-$;



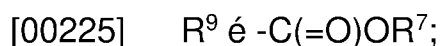
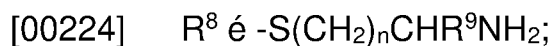
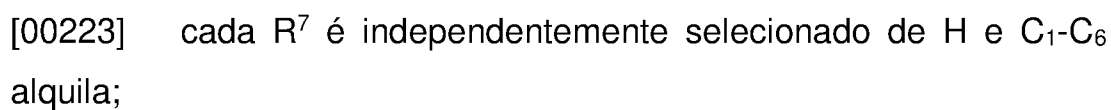
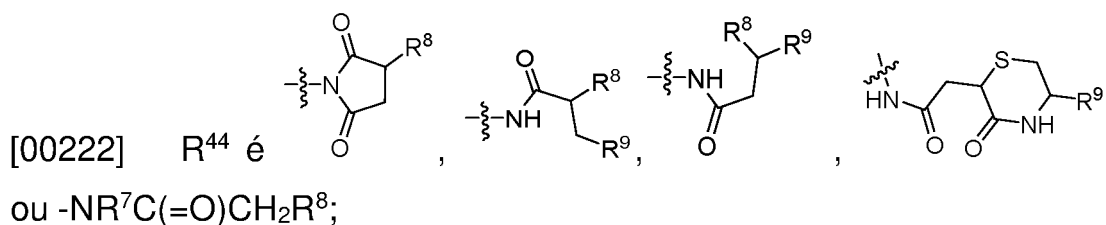
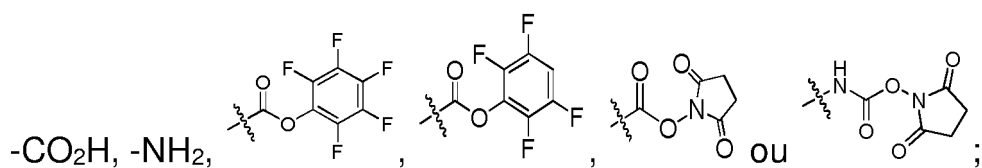
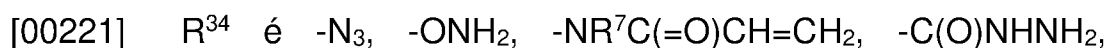
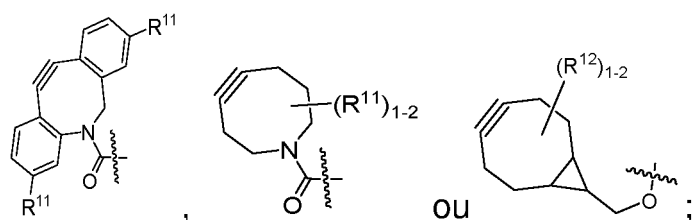
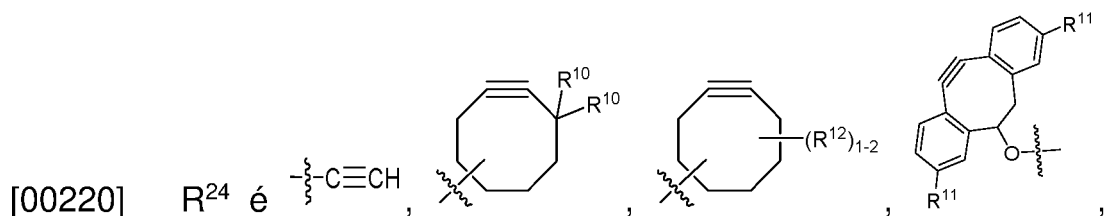
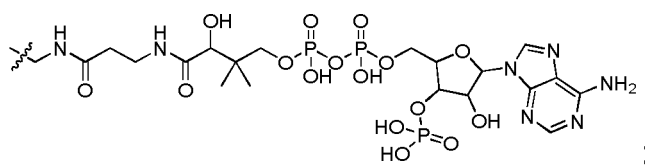


[00219] R^{14} é , $-N_3$, $-ONH_2$, $-NR^7C(=O)CH=CH_2$, SH , $-S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NR^7S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NR^7C(=O)CH_2Br$, $-NR^7C(=O)CH_2I$, $-NHC(=O)CH_2Br$, $-NHC(=O)CH_2I$, $-C(O)NHNH_2$,





OU



C₆alquila, F, Cl e -OH;

[00227] cada R¹¹ é independentemente selecionado dentre H, C₁-C₆alquila, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ e -OH;

[00228] cada R¹² é independentemente selecionado dentre H, C₁₋₆alquila, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por

-C(=O)OH, C₁₋₄alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄alquila substituída por -C(=O)OH;

[00229] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

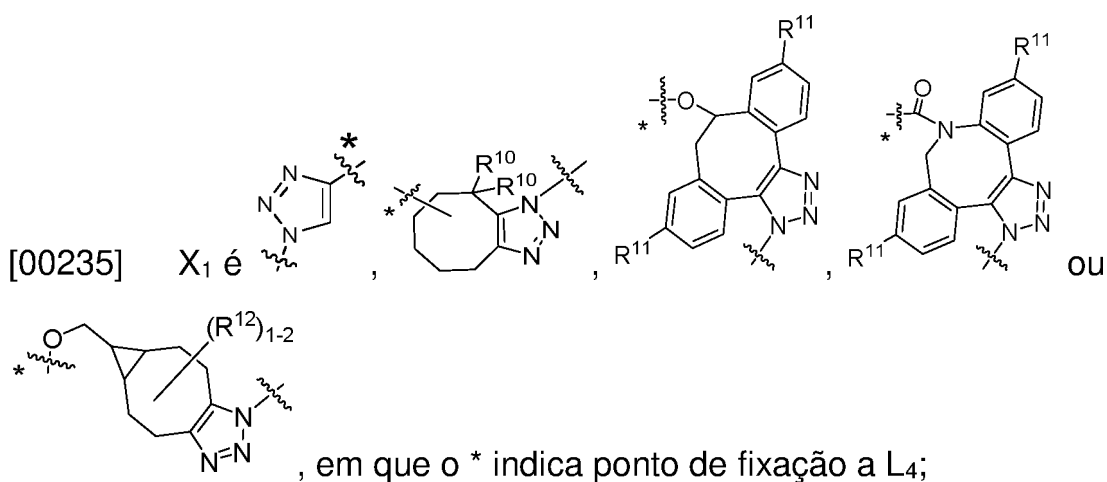
[00230] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

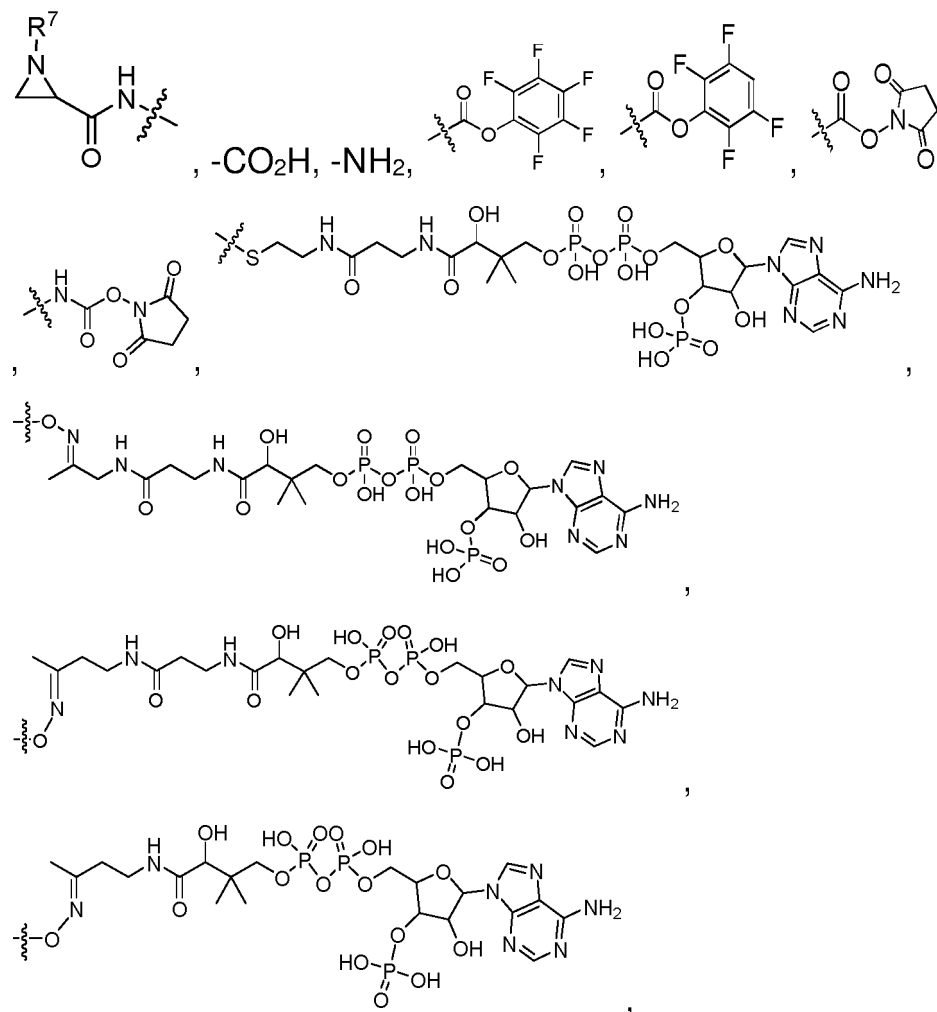
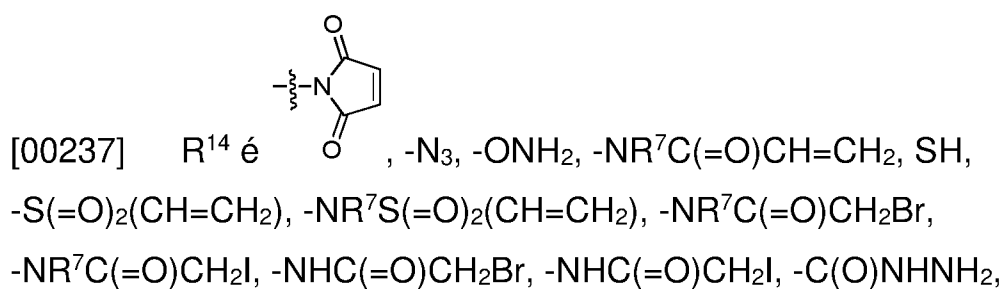
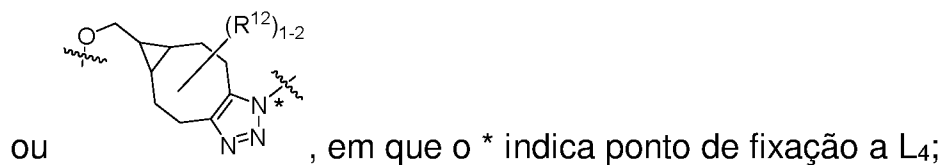
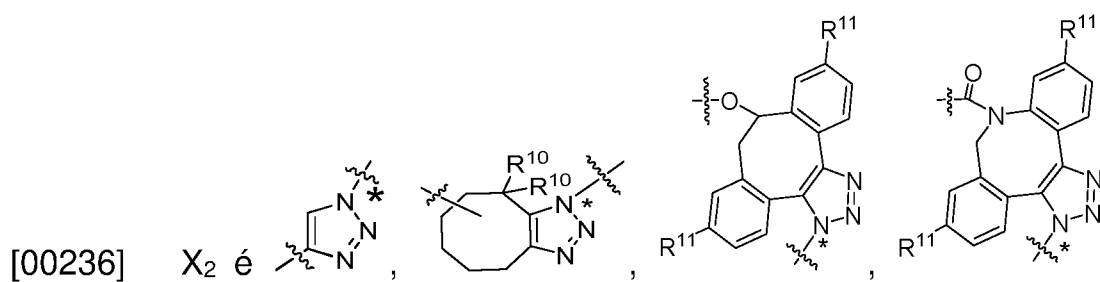
[00231] Modalidade 6. O composto de Fórmula (A), Fórmula (A-2), Fórmula (A-3), Fórmula (A-2a) ou Fórmula (A-3a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

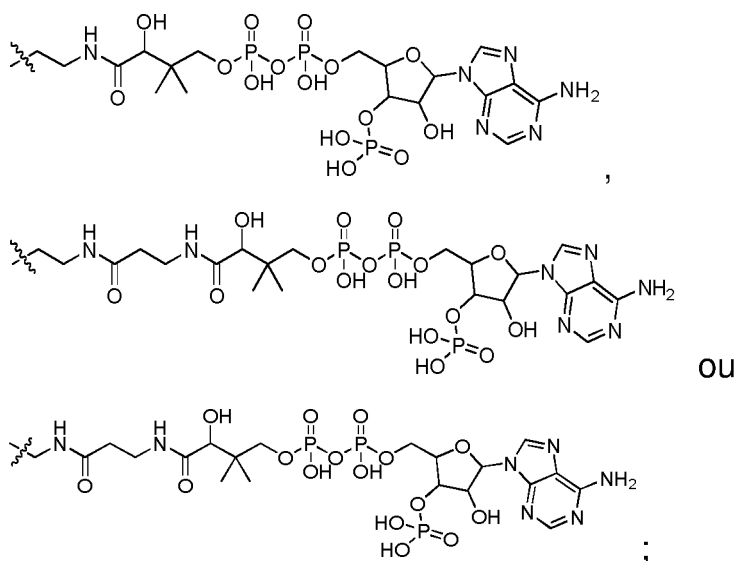
[00232] em que:

[00233] L₄ é -(CH₂)_m-;

[00234] L₅ é -NHS(=O)₂(CH₂)_mX₁L₄-, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄-, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄-, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m- ou -NH(CH₂)_m-;







[00238] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00239] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e -OH;

[00240] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e -OH;

[00241] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00242] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00243] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

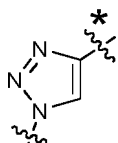
[00244] Modalidade 7. O composto de Fórmula (A), Fórmula (A-1) ou Fórmula (A-1a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

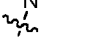
[00245] R^4 é $-L_1R^{14}$;

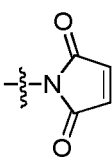
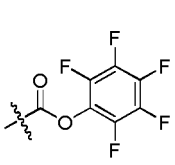
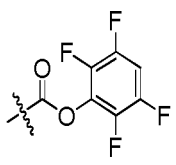
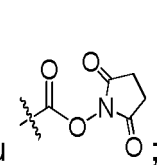
[00246] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$ ou $-(CH_2)_m^-$;

[00247] L_4 é $-(CH_2)_m^-$;

[00248] L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$;



[00249] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

[00250] R^{14} é , $-ONH_2$, ,  ou .

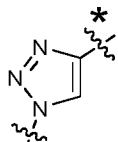
[00251] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

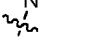
[00252] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

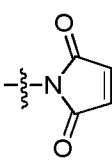
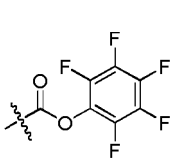
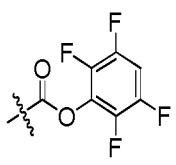
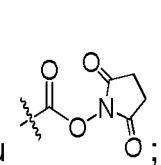
[00253] Modalidade 8. O composto de Fórmula (A), Fórmula (A-2), Fórmula (A-3), Fórmula (A-2a) ou Fórmula (A-3a), ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que:

[00254] L_4 é $-(CH_2)_m-$;

[00255] L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$;



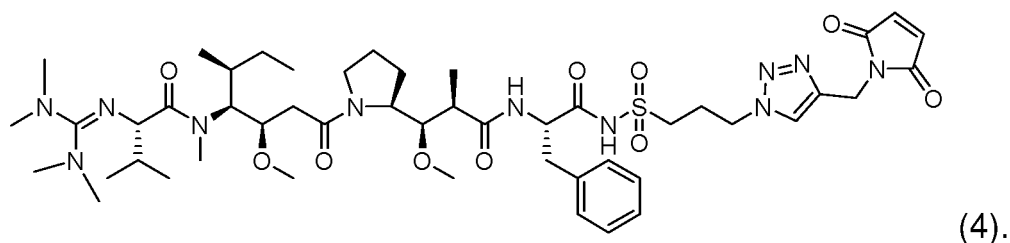
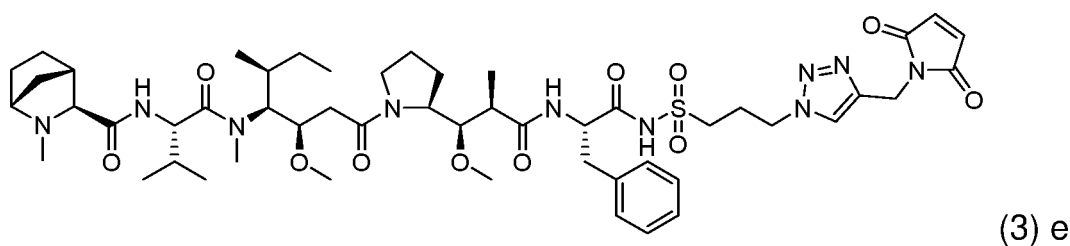
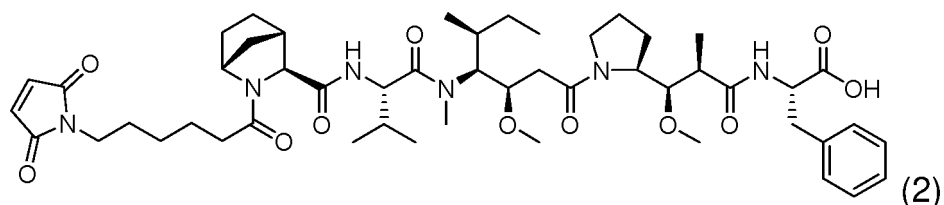
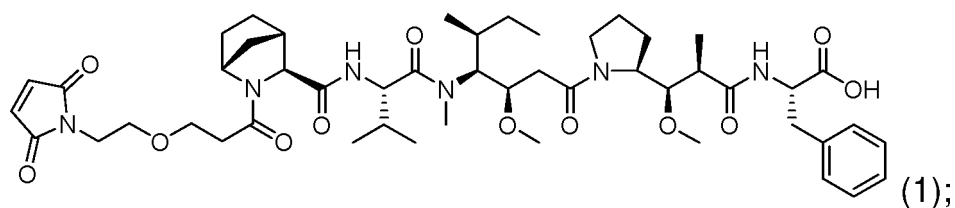
[00256] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

[00257] R^{14} é , $-ONH_2$, ,  ou .

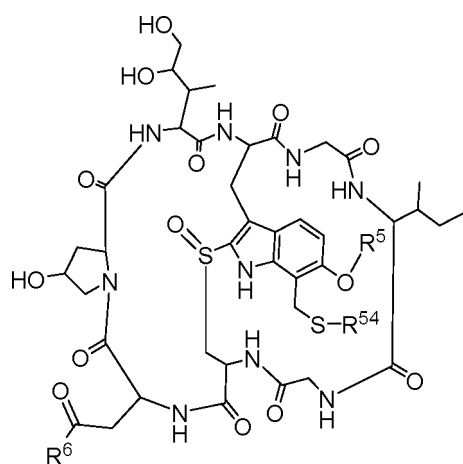
[00258] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00259] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00260] Modalidade 9. O composto de Fórmula (A) selecionado dentre:



[00261] Modalidade 10. O composto de Fórmula (B), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fórmula (B-1), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:

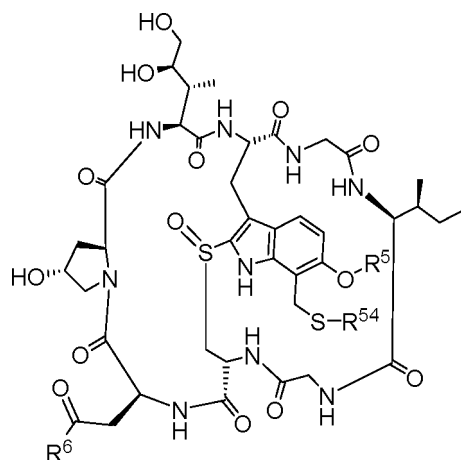


Fórmula (B-1),

[00262] em que: R^{54} , R^5 e R^6 são conforme definidos acima.

[00263] Modalidade 11. O composto de Fórmula (B), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem uma estrutura de Fór-

mula (B-1a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula (B-1a)

[00264] em que: R^{54} , R^5 e R^6 são conforme definidos acima.

[00265] Modalidade 12. O composto de Fórmula (B), Fórmula (B-1) ou Fórmula (B-1a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

[00266] em que:

[00267] R^{54} é $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$, $-L_7R^{34}$ ou $-L_8R^{44}$;

[00268] R^5 é H, $-\text{CH}_3$ ou $-\text{CD}_3$;

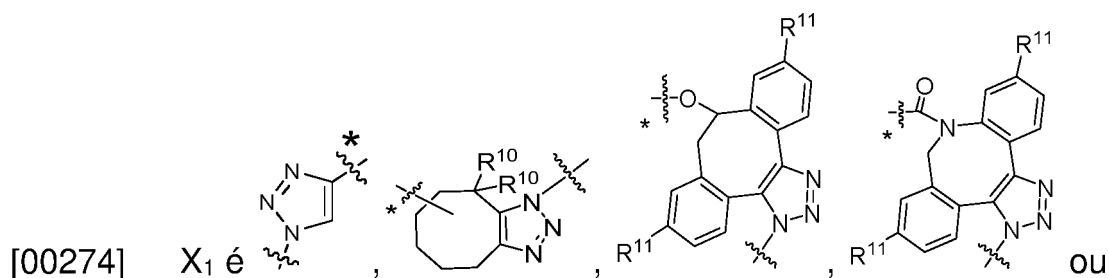
[00269] R^6 é $-\text{NH}_2$ ou $-\text{OH}$;

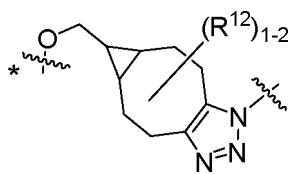
[00270] L_6 é $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4^-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4^-$, $-L_4\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4^-$, $-L_4\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4^-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m^-$ ou $-(\text{CH}_2)_m^-$;

[00271] L_7 é $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m^-$;

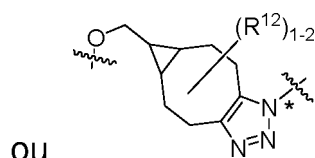
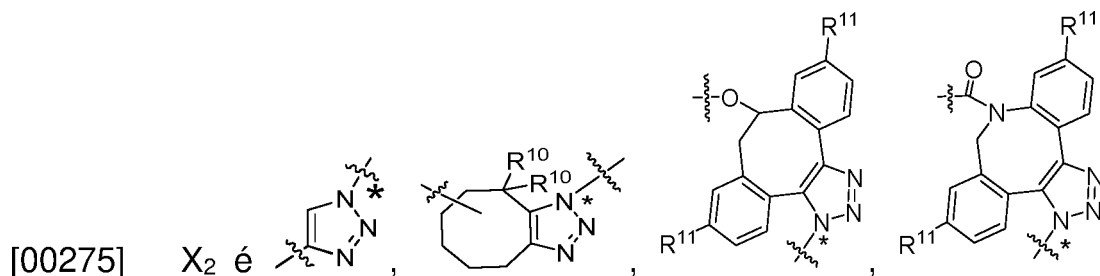
[00272] L_8 é $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4^-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4^-$, $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m^-$, $-(\text{CH}_2)_m^-$;

[00273] L_4 é $-(\text{CH}_2)_m^-$;

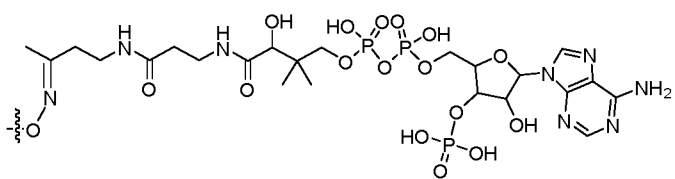
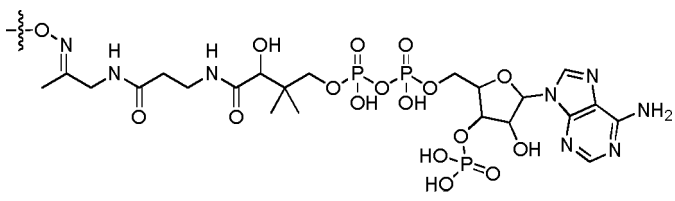
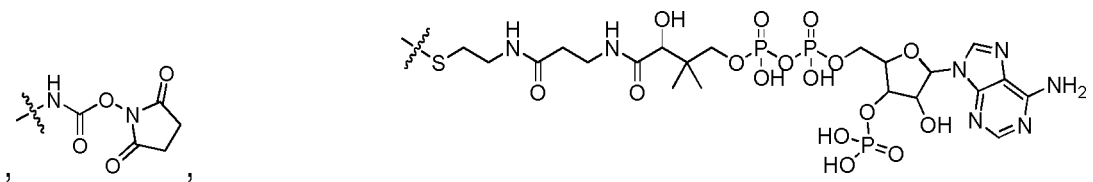
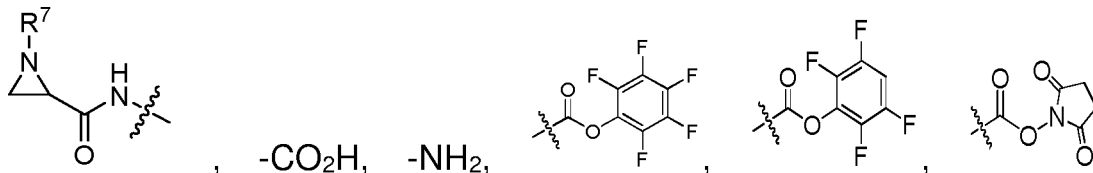
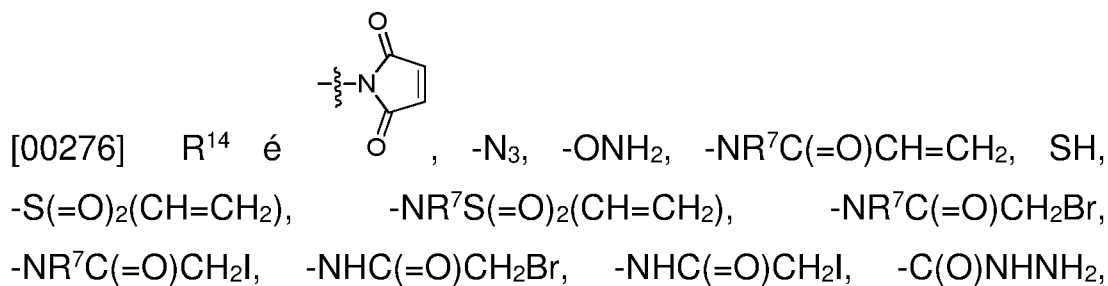


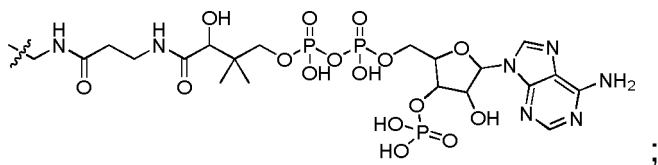
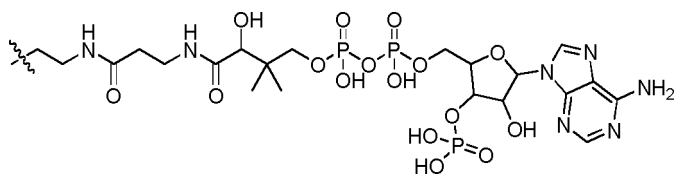
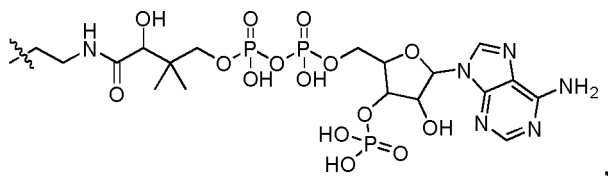
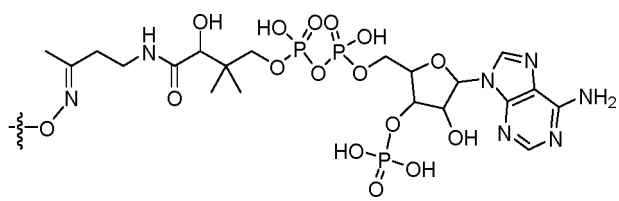


, em que o * indica ponto de fixação a L4;

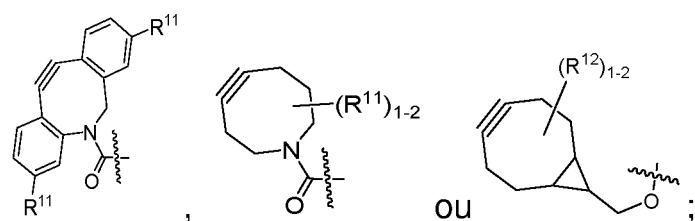
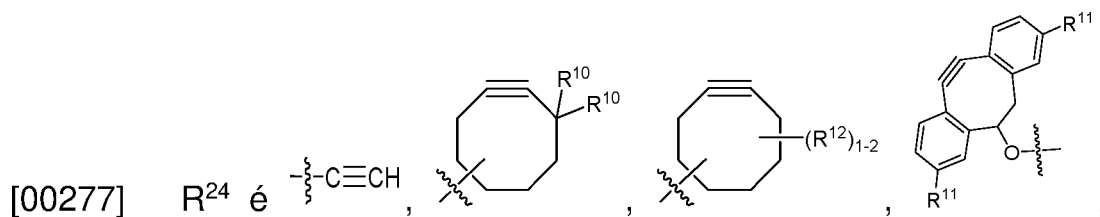


ou , em que o * indica ponto de fixação a L4;



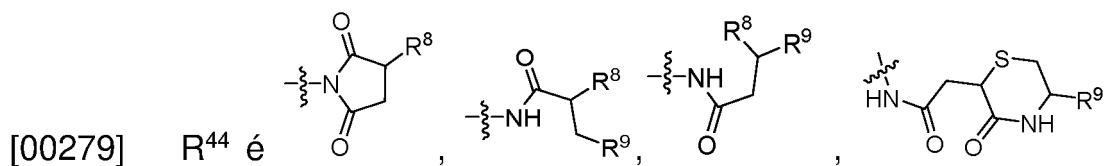
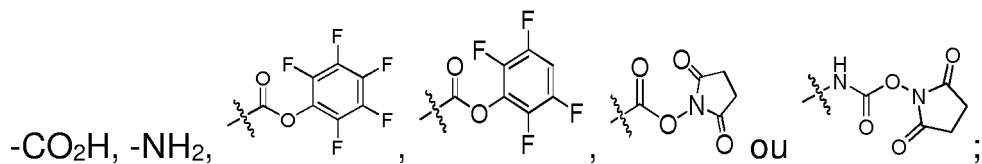


ou



ou

[00278] R^{34} é $-N_3$, $-ONH_2$, $-NR^7C(=O)CH=CH_2$, $-C(O)NHNH_2$,



ou $-NR^7C(=O)CH_2R^8$;

[00280] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1-C_6

alquila;

[00281] R^8 é $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

[00282] R^9 é $-C(=O)OR^7$;

[00283] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1-C_6 alquila, F, Cl e $-OH$;

[00284] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1-C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e $-OH$;

[00285] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1-C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00286] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00287] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00288] Modalidade 13. O composto de Fórmula (B), Fórmula (B-1) ou Fórmula (B-1a), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

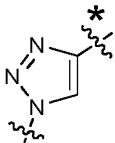
[00289] R^{54} é $-L_6R^{14}$;

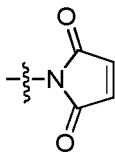
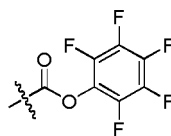
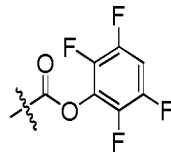
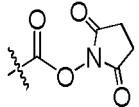
[00290] R^5 é $-CH_3$;

[00291] R^6 é $-NH_2$;

[00292] L_6 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$,
 $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-L_4NHC(=O)NH$
 $((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$ ou $-(CH_2)_m-$;

[00293] L_4 é $-(CH_2)_m-$;

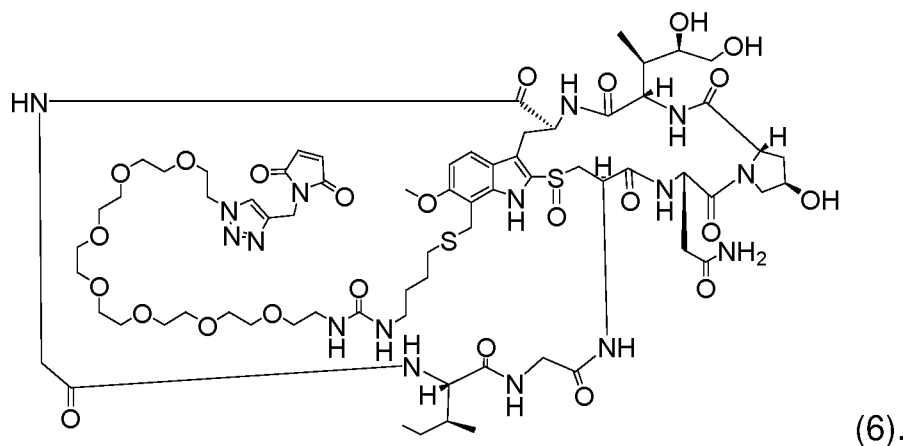
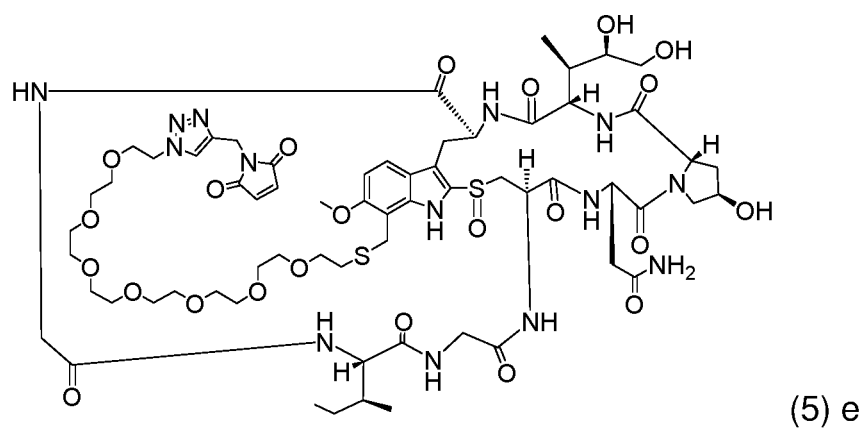
[00294] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

[00295] R^{14} é , $-\text{ONH}_2$, ,  ou ;

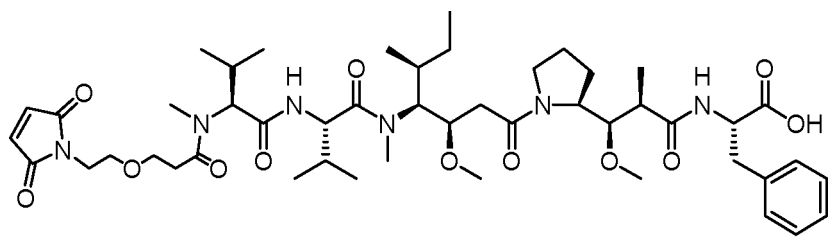
[00296] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

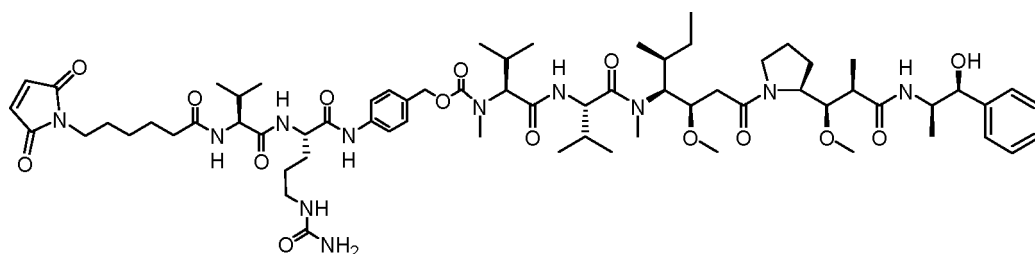
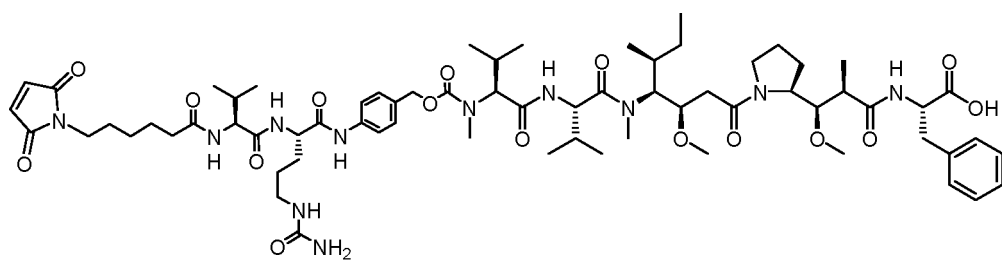
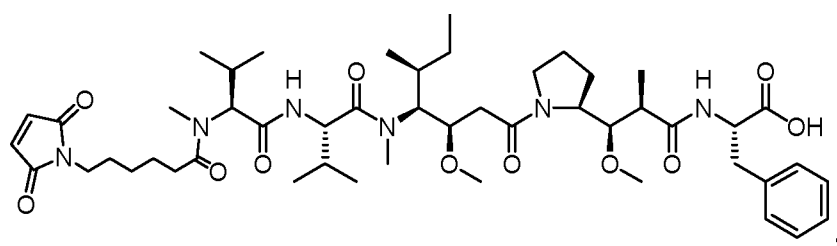
[00297] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00298] Modalidade 14. O composto de Fórmula (B) selecionado dentre:

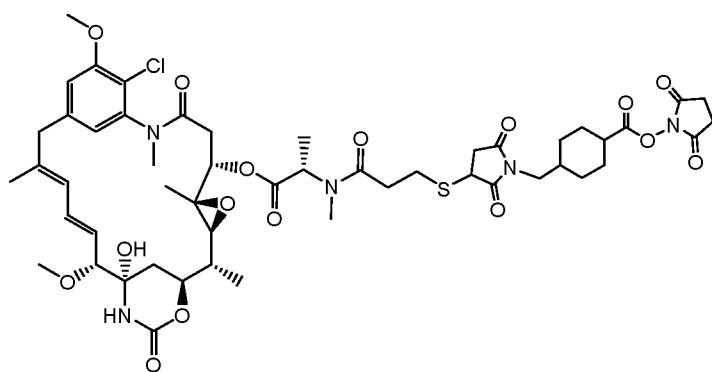


[00299] Em outro aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção é selecionada dentre:

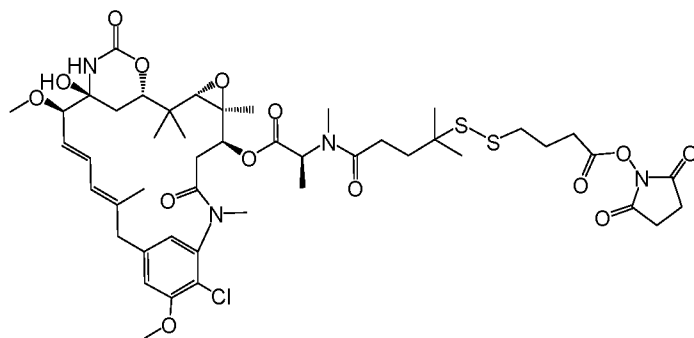




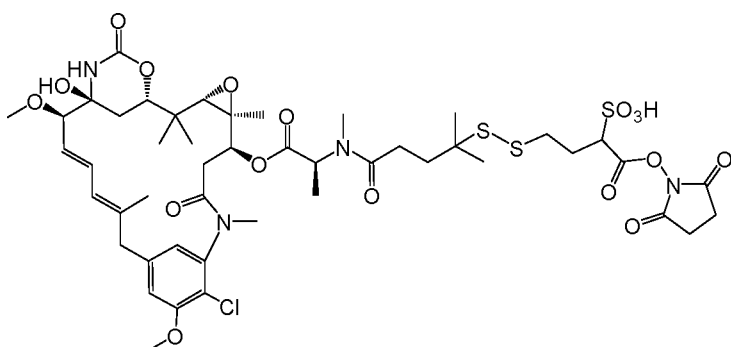
[00300] Em outro aspecto, a porção química de Ligante-Fármaco da invenção é selecionada dentre:



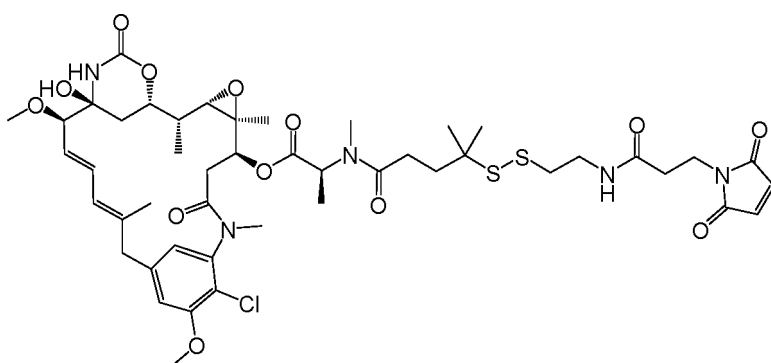
(SMCC-DM1),



(SPDB-DM4),



(sulfo-SPDB-DM4) e



(MPET-DM4).

Conjugados de Fármaco de Anticorpo

[00301] A presente descrição fornece conjugados de fármaco de anticorpo, em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT é ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. Em um aspecto, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') é ligado, por meio de ligação covalente por um ligante, a uma porção química de fármaco que é um agente citotóxico.

[00302] Os conjugados de fármaco de anticorpo podem entregar seletivamente um agente citotóxico às células que expressam cKIT, por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, ablam seletivamente, assim, aquelas células em um paciente, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética. Preferencialmente, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT têm meia-vida curta e serão eliminados da circulação de um paciente, então podem ser usados para condicionar recipientes de transplante de célula-tronco hematopoiética antes do transplante de célula-tronco hematopoiética.

[00303] Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT revelados no presente documento são modificados para ter capacidade reduzida de induzir degranulação de mastócito, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores. Por exemplo, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT revelados no presente documento são modificados para ter uma capacidade reduzida para induzir degranulação de mastócito, ou seja, é cerca de, ou é pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% reduzida em comparação a um anticorpo cKIT de comprimento total, um fragmento F(ab')₂ ou F(ab)₂, ou conjugados dos mesmos, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores. Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo cKIT revelados no presente documento podem compreender um fragmento Fab ou Fab' anti-cKIT. Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo anti-cKIT revelados no presente documento podem ter atividade mínima para induzir a degranulação de mastócito, por exemplo, um mostrador de O.D. corrigido na linha de base menor do que 0,25, por exemplo, menor do que 0,2, menor do que 0,15 ou menor do que 0,1, em um ensaio de liberação de beta-hexosaminidase, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores.

[00304] Em algumas modalidades, são fornecidos no presente documento conjugados que compreendem um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT (Fab ou Fab' anti-cKIT), ligado a uma porção química de fármaco (por exemplo, um agente citotóxico), opcionalmente através de um ligante. Conforme descrito no presente documento, tais conjugados de toxina de Fab' ou Fab anti-cKIT têm capacidade de ablar células de HSC humana *in vitro* e *in vivo*, mas não causam degranulação de mastócito mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores.

[00305] Em um aspecto, a descrição fornece um conjugado de Fórmula (I):



[00306] em que:

[00307] A é um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00308] L_B é um ligante;

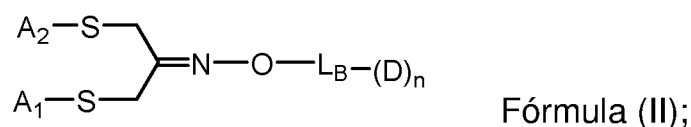
[00309] D é um agente citotóxico;

[00310] n é um número inteiro de 1 a 10, e

[00311] y é um número inteiro de 1 a 10,

[00312] em que a porção química de Ligante-Fármaco ($L_B-(D)_n$) é covalentemente fixada ao fragmento de anticorpo (A).

[00313] Em um aspecto, a presente descrição é direcionada a um conjugado de Fórmula (II):



[00314] A_1 é um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') ou cadeia (por exemplo, HC ou LC) que se liga especificamente a cKIT humano;

[00315] A_2 é um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') ou cadeia (por exemplo, HC ou LC) que se liga especificamente a cKIT humano;

[00316] L_B é um ligante;

[00317] D é um agente citotóxico, e

[00318] n é um número inteiro de 1 a 10,

[00319] em que a porção química de Ligante-Fármaco ($L_B-(D)_n$) se acopla covalentemente aos fragmentos de anticorpo A_1 e A_2 .

[00320] Em um aspecto, a uma ou mais porções químicas de fármaco, D, nos conjugados de Fórmula (I) e Fórmula (II) são independentemente selecionadas dentre uma auristatina, uma amanitina, um

maitansinoide e uma saporina.

[00321] Em outro aspecto, a uma ou mais porções químicas de fármaco, D, nos conjugados de Fórmula (I) são independentemente selecionadas dentre uma auristatina e uma amanitina.

[00322] Nos conjugados de Fórmula (I), uma ou mais porções químicas de Ligante-Fármaco ($L_B-(D)_n$) podem ser covalentemente fixadas ao fragmento de anticorpo, A (por exemplo, Fab ou Fab'), ligando, assim, covalentemente uma ou mais porções químicas de fármaco, D, ao fragmento de anticorpo, A (por exemplo, Fab ou Fab'), através de ligante, L_B . L_B é qualquer porção química que tem capacidade de ligar o fragmento de anticorpo, A (por exemplo, Fab ou Fab') a uma ou mais porções químicas de fármaco, D. Os conjugados de Fórmula (I), em que uma ou mais porções químicas de fármaco, D, são covalentemente ligadas a um fragmento de anticorpo, A (por exemplo, Fab ou Fab'), podem ser formados com o uso de um reagente de ligante bifuncional ou multifuncional que tem um ou mais grupos funcionais reativos que são iguais ou diferentes. Um dos grupos funcionais reativos do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional é usado para reagir com um grupo no fragmento de anticorpo, A, a título de exemplo, um tiol ou uma amina (por exemplo, uma cisteína, um terminal N ou cadeia lateral de aminoácido, tal como lisina) para formar uma ligação covalente com uma extremidade do ligante L_B . Tais grupos funcionais reativos do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional incluem, porém sem limitação, uma maleimida, um tiol e um éster NHS. O outro grupo ou grupos funcionais reativos do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional são usados para fixar covalentemente uma ou mais porções químicas de fármaco, D, ao ligante L_B .

[00323] Nos conjugados de Fórmula (II), uma ponte de cetona é formada por reação de tióis pendentes em fragmentos de anticorpo A_1 e A_2 e um 1,3-di-haloacetona, tal como 1,3-dicloroacetona, 1,3-

dibromoacetona, 1,3-di-iodoacetona, e ésteres de bissulfonato de 1, 3-di-hidroxiacetona, que, assim, acopla covalentemente os fragmentos de anticorpo A_1 e A_2 . Essa porção química de ponte de cetona é usada para fixar covalentemente uma ou mais porções químicas de fármaco, D, aos fragmentos de anticorpo A_1 e A_2 através de um ligante L_B . L_B é qualquer porção química que tem capacidade de ligar o fragmento de anticorpo, A_1 e A_2 a uma ou mais porções químicas de fármaco, D. Os conjugados de Fórmula (II), em que uma ou mais porções químicas de fármaco, D, são covalentemente ligadas aos fragmentos de anticorpo A_1 e A_2 , podem ser formados com o uso de um reagente de ligante bifuncional ou multifuncional que tem um ou mais grupos funcionais reativos que são iguais ou diferentes. Em uma modalidade, um grupo funcional reativo do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional é uma alcoxiamina que é usada para reagir com a ponte de cetona para formar uma ligação de oxima com uma extremidade do ligante L_B , e o outro grupo ou grupos funcionais reativos do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional são usados para fixar covalentemente uma ou mais porções químicas de fármaco, D, ao ligante L_B . Em outra modalidade, um grupo funcional reativo do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional é uma hidrazina que é usada para reagir com a ponte de cetona para formar uma ligação de hidrazona com uma extremidade do ligante L_B , e o outro grupo ou grupos funcionais reativos do reagente de ligante bifuncional ou multifuncional são usados para fixar covalentemente uma ou mais porções químicas de fármaco, D, ao ligante L_B .

[00324] Em um aspecto, L_B é um ligante passível de clivagem. Em outro aspecto, L_B é um ligante não passível de clivagem. Em alguns aspectos, L_B é um ligante lábil a ácido, ligante fotolábil, ligante passível de clivagem por peptidase, ligante passível de clivagem por esterase, ligante passível de clivagem por glicosidase, ligante passível de cliva-

gem por fosfodiesterase, um ligante passível de redução por ligação de dissulfeto, um ligante hidrofílico ou um ligante à base de ácido dicarboxílico.

[00325] Em outro aspecto, a porção química de fármaco (D) é uma toxina proteica selecionada dentre saporina, proteína antiviral de tintureira (PAP), briodina 1, bouganina, gelonina, ricina, abrina, lectina de visco, modicina, volkensina, asparina, momordina, ebulina, viscumina, toxina Shiga, toxina de difteria (DT) ou exotoxina de *Pseudomonas* (PE). Tais toxinas proteicas têm capacidade de eliminar células inativando ribossomos ou inibindo a síntese de proteína por interferência com a função de fator de alongamento 2 (EF2) (consultar Kreitman et al., Immunotoxins for targeted cancer therapy, The AAPS Journal 2006; 8 (3) Article 63; Gadadhar e Karande, Targeted Cancer Therapy: History and Development of Immunotoxins, Capítulo 1 de Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy, páginas 1 a 31). Em algumas modalidades, a toxina proteica é saporina. A toxina proteica pode ser fixada ao fragmento de anticorpo anti-cKIT (A) covalentemente através de um ligante passível de clivagem ou não passível de clivagem (L_B). Em algumas modalidades, a toxina proteica está ligada ao fragmento de anticorpo anti-cKIT através de uma ligação de dissulfeto ou tioéter.

[00326] Embora a razão entre fármaco e anticorpo tenha um valor de número inteiro exato para uma molécula de conjugado específica (por exemplo, o produto de n e y na Fórmula (I) e " n " na Fórmula (II)), é entendido que o valor será frequentemente um valor médio quando usado para descrever uma amostra contendo muitas moléculas, devido a algum grau de falta de homogeneidade, tipicamente associada à etapa de conjugação. O carregamento médio para uma amostra de um conjugado é denominado no presente documento como a razão entre fármaco e anticorpo (ou Fab'), ou "DAR." Em alguns aspectos, a DAR está entre cerca de 1 e cerca de 5 e, tipicamente, é cerca de 1, 2, 3 ou

4. Em alguns aspectos, pelo menos 50% de uma amostra em peso são composto que tem a DAR médio mais ou menos 2 e, de preferência, pelo menos 50% da amostra são um conjugado que contém a DAR média mais ou menos 1. Outros aspectos incluem conjugados em que a DAR é cerca de 2. Em alguns aspectos, uma DAR de "cerca de y" significa que o valor medido para DAR está dentro de 20% do produto de n e y na Fórmula (I). Em alguns aspectos, uma DAR de "cerca de n" significa que o valor medido para DAR está dentro de 20% de n na Fórmula (II).

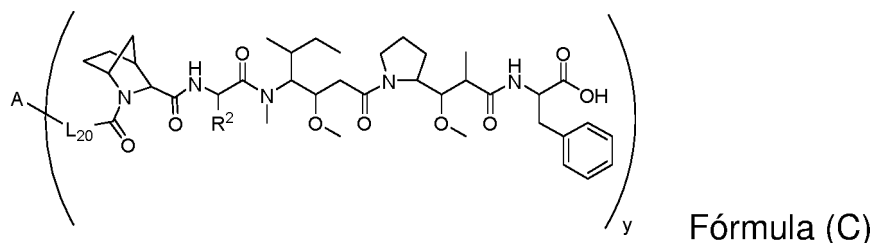
[00327] Em um aspecto, a razão molar média entre o fármaco e o fragmento de anticorpo (Fab ou Fab') nos conjugados de Fórmula (I) (isto é, valor médio do produto de n e y, também conhecido como a razão entre fármaco e anticorpo (DAR)) é cerca de 1 a cerca de 10, cerca de 1 a cerca de 6 (por exemplo, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 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), cerca de 1 a cerca de 5, cerca de 1,5 a cerca de 4,5 ou cerca de 2 a cerca de 4.

[00328] Em um aspecto, a razão molar média entre o fármaco e os fragmentos de anticorpo A₁ e A₂ nos conjugados de Fórmula (II) (isto é, valor médio de n, também conhecido como razão entre fármaco e anticorpo (DAR)) é cerca de 1 a cerca de 10, cerca de 1 a cerca de 6 (por exemplo, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 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), cerca de 1 a cerca de 5, cerca de 1,5 a cerca de 4,5 ou cerca de 2 a cerca de 4.

[00329] Em um aspecto fornecido pela descrição, o conjugado tem pureza substancialmente alta e tem uma ou mais das seguintes características: (a) maior do que cerca de 90% (por exemplo, maior ou igual

a cerca de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%), de preferência, maior do que cerca de 95%, de espécies conjugadas são monoméricas, (b) nível de ligante não conjugado na preparação é menor do que cerca de 10% (por exemplo, menor ou igual a cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0%) (em relação ao ligante total), (c) menor do que 10% de espécies conjugadas são reticuladas (por exemplo, menor ou igual a cerca de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0%), (d) nível de fármaco livre (por exemplo, auristatina, amanitina, maitansinoide ou saporina) na preparação de conjugado é menor do que cerca de 2% (por exemplo, menor ou igual a cerca de 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).

[00330] Em um aspecto, os conjugados da invenção têm a estrutura de Fórmula (C):



[00331] em que:

[00332] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00333] y é um número inteiro de 1 a 10;

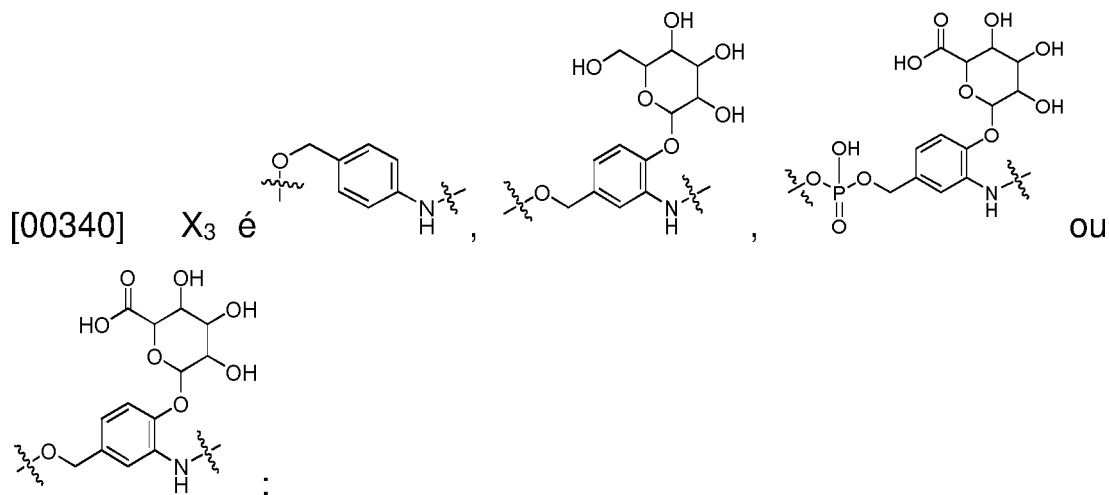
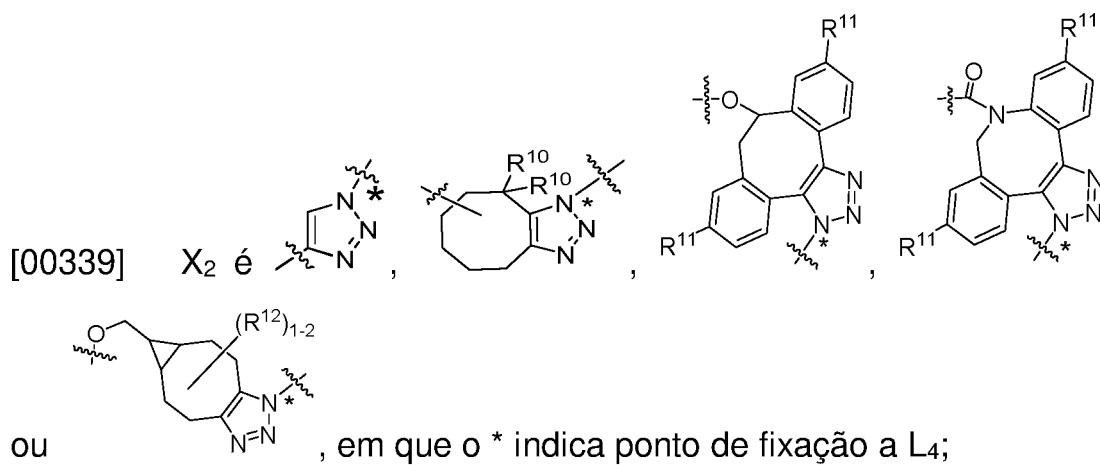
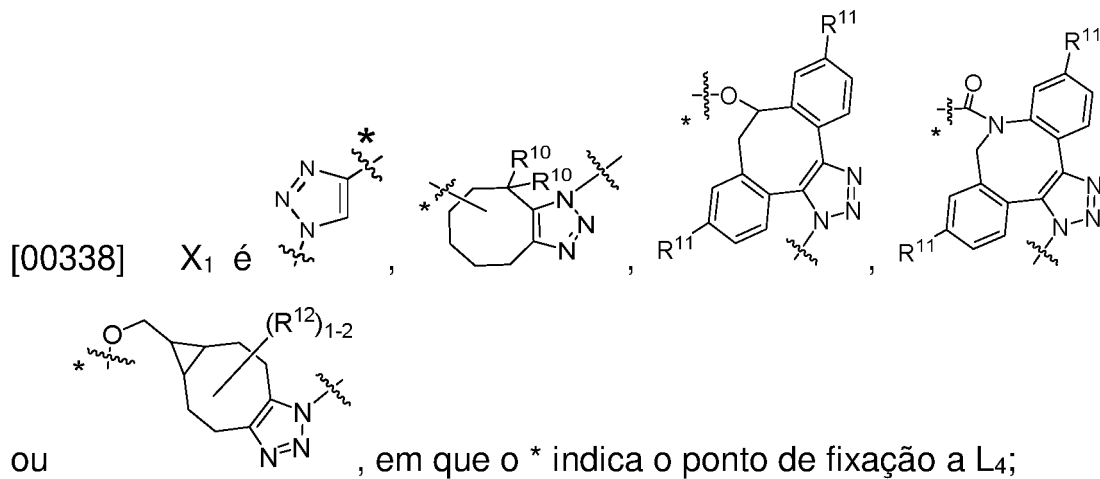
[00334] R² é C₁-C₆ alquila;

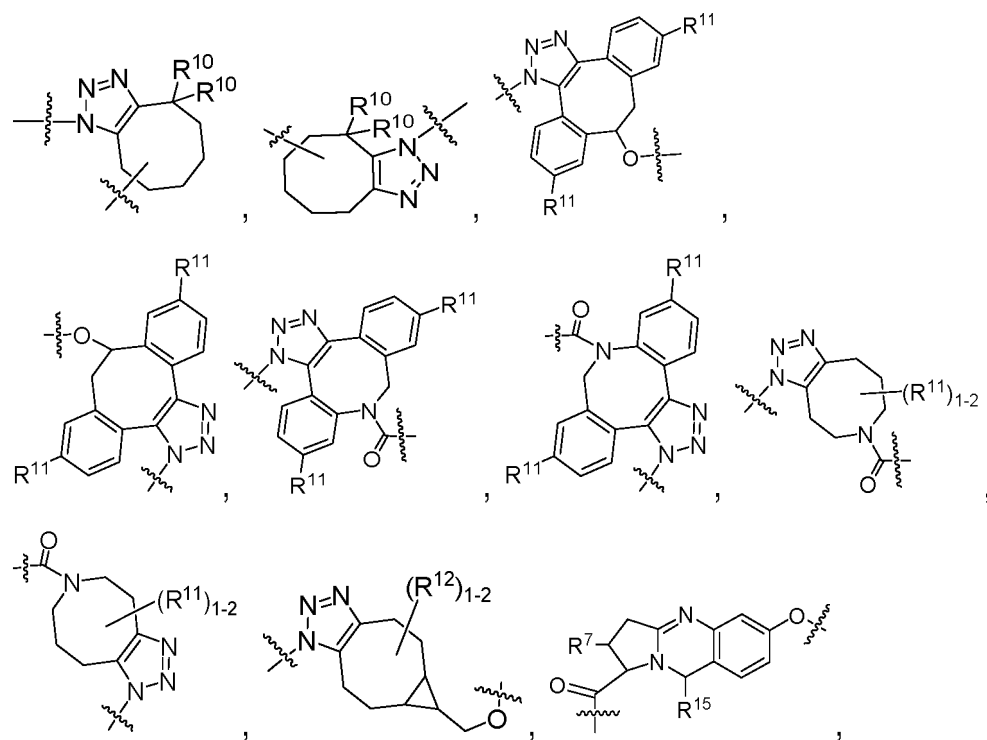
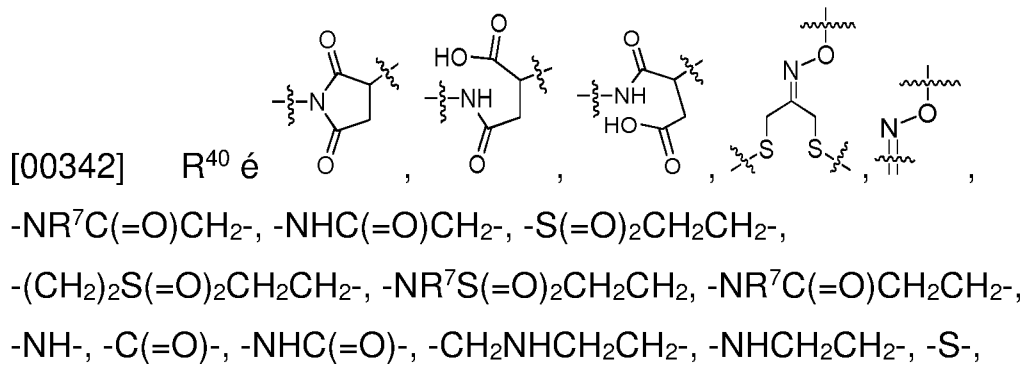
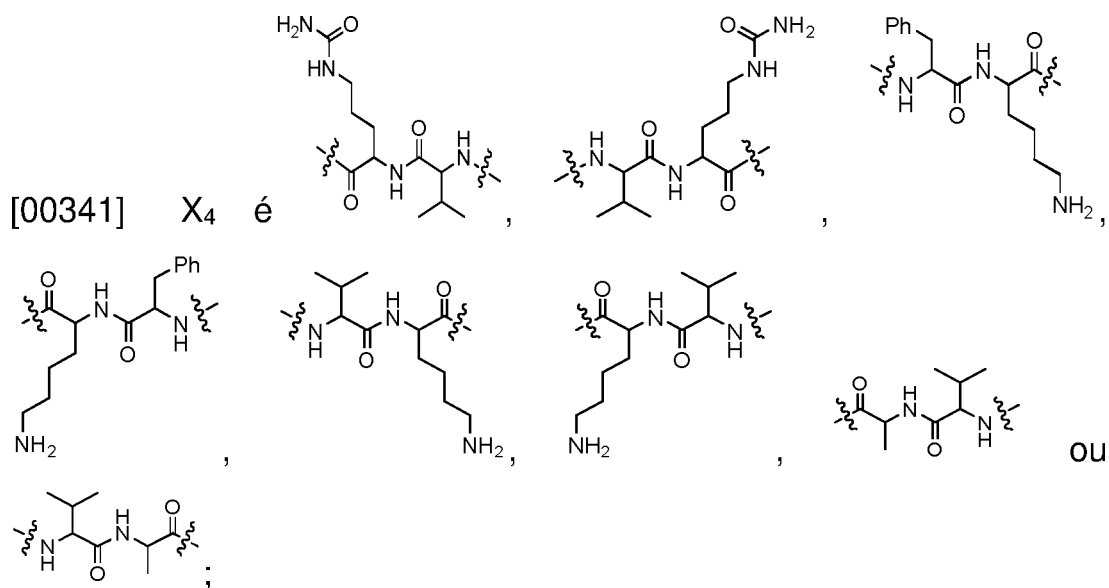
[00335] L₂₀ é -L₁R⁴⁰;

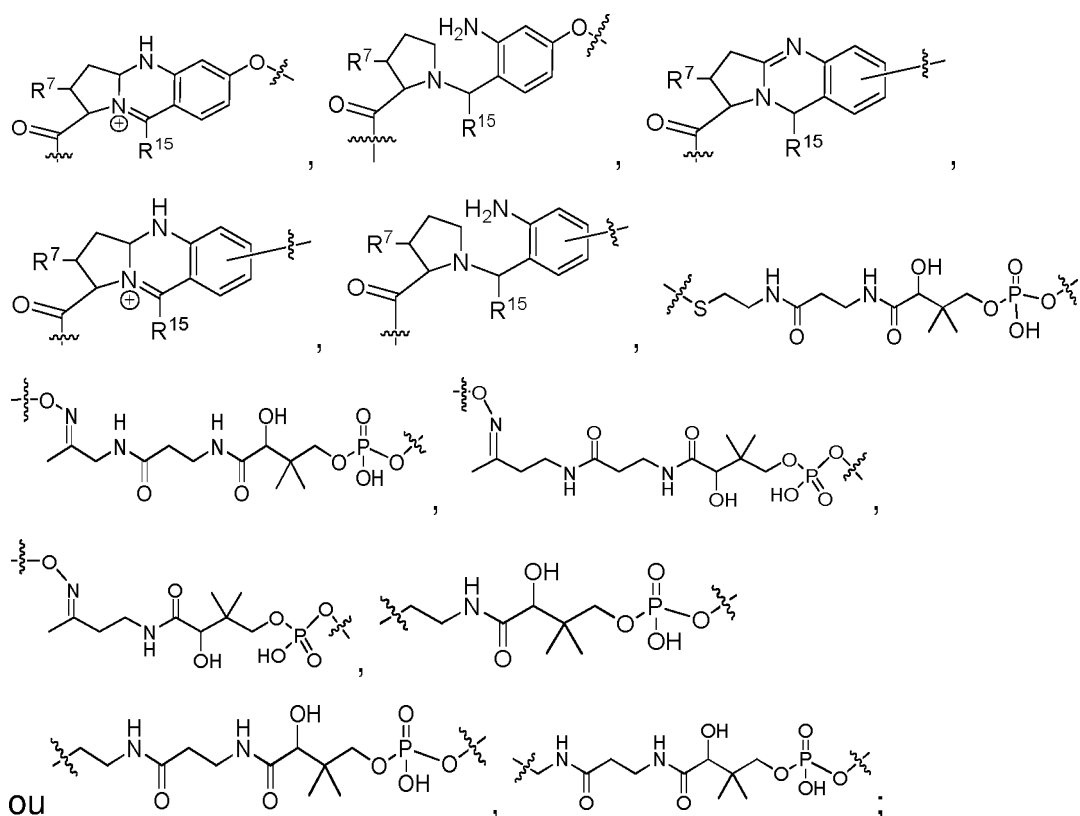
[00336] L₁ é -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻,
 -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₁(CH₂)_m⁻,
 -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻, -
 ((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m, -((CH₂)_mO)_pCH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
 X₃X₄C(=O)((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -X₃X₄C(=O)(CH₂)_m⁻,

- X₃C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_m-,
 -X₃C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m-, -(CH₂)_mC(R₇)₂-,
 -(CH₂)_mC(R₇)₂SS(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m- ou
 -(CH₂)_mX₃C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m-;

[00337] L₄ é -((CH₂)_m;







[00343] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00344] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e -OH;

[00345] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e -OH;

[00346] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_1 -4alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_1 -4 alquila substituída por $-C(=O)OH$;

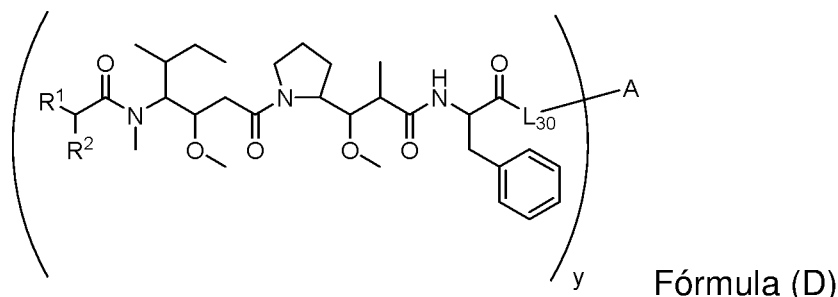
[00347] cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, $-CH_3$ e fenila;

[00348] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00349] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00350] Em outro aspecto, os conjugados da invenção têm a estru-

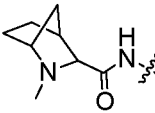
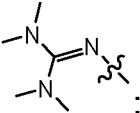
tura de Fórmula (D):



[00351] em que:

[00352] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00353] y é um número inteiro de 1 a 10;

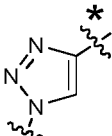
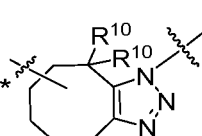
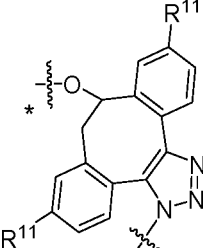
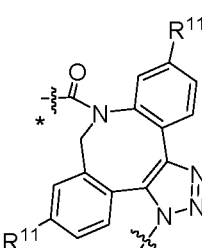
[00354] R¹ é  ou ;

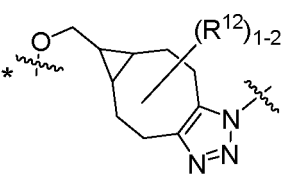
[00355] R² é C₁-C₆ alquila;

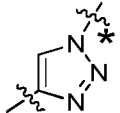
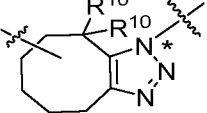
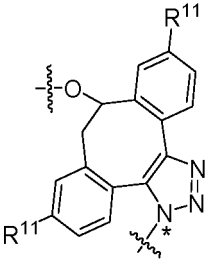
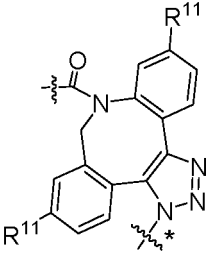
[00356] L₃₀ é -L₅R⁴⁰;

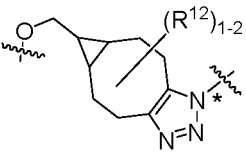
[00357] L₄ é -((CH₂)_m);

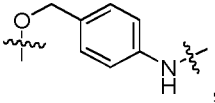
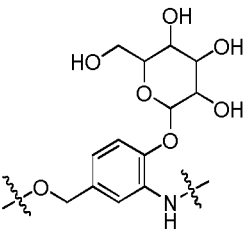
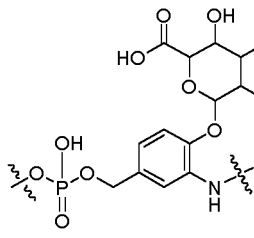
[00358] L₅ é -NHS(=O)₂(CH₂)_mX₁L₄, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻,
 -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -NH(CH₂)_m⁻,
 -NH(CH₂)_mX₁(CH₂)_m⁻, -NH(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻,
 -NH(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
 -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m,
 -NH((CH₂)_mO)_pCH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻, -NH(CH₂)_nC(R₇)₂⁻,
 -NH(CH₂)_mC(R₇)₂SS(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻ ou
 -NH(CH₂)_mX₃C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻;

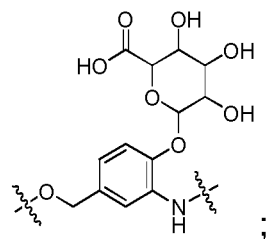
[00359] X₁ é , , , 

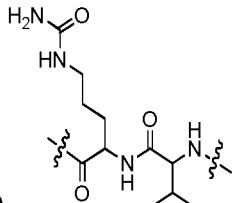
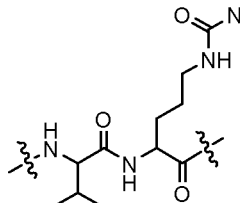
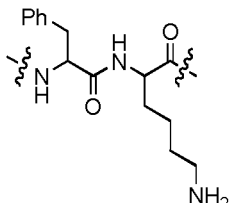
ou , em que o * indica ponto de fixação a L4;

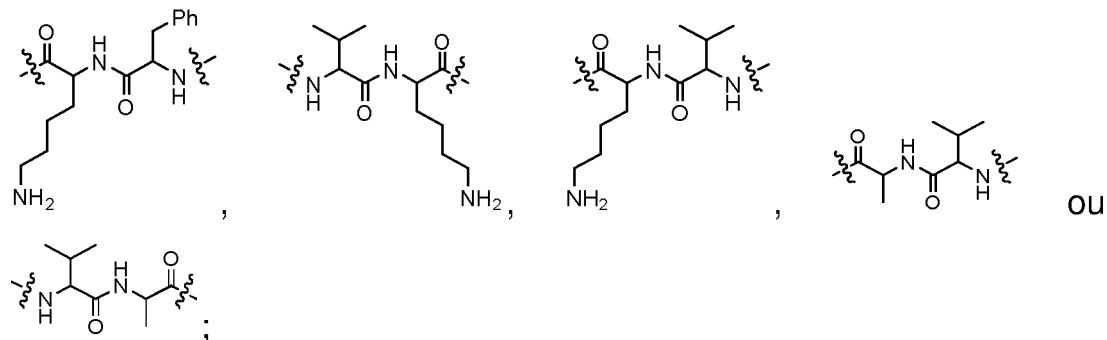
[00360] X_2 é , , , ,

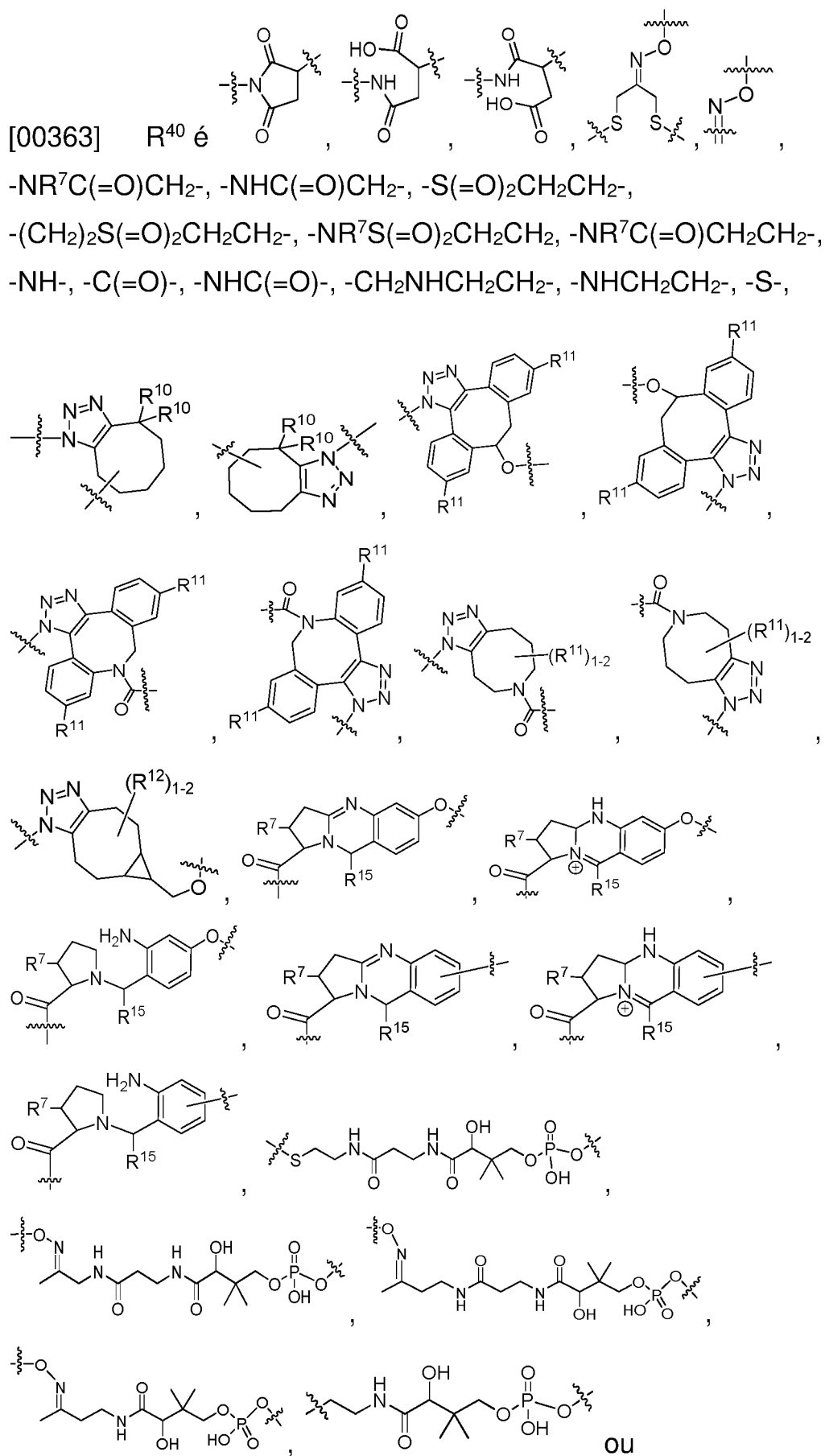
ou , em que o * indica ponto de fixação a L4;

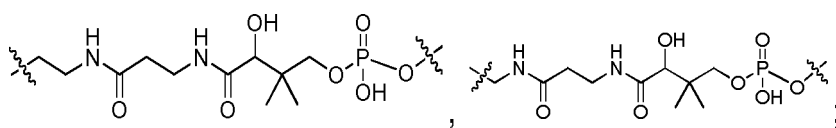
[00361] X_3 é , ,  ou



[00362] X_4 é , , ,







[00364] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00365] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e -OH;

[00366] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e -OH;

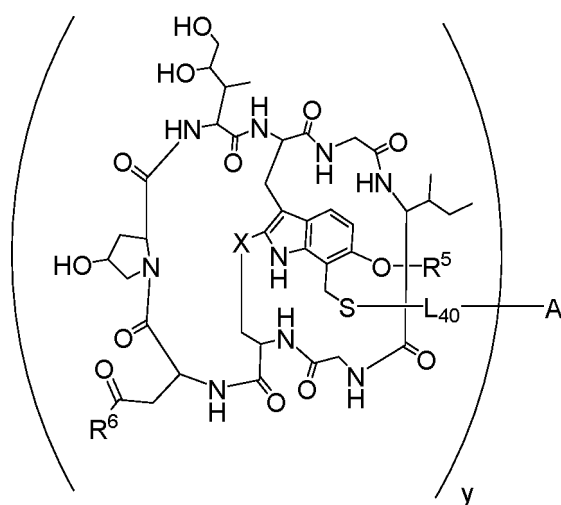
[00367] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00368] cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, $-CH_3$ e fenila;

[00369] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00370] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00371] Em outro aspecto, os conjugados da invenção têm a estrutura de Fórmula (E):



Fórmula (E)

[00372] em que:

[00373] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00374] y é um número inteiro de 1 a 10;

[00375] X é S(=O), S(=O)₂ ou S;

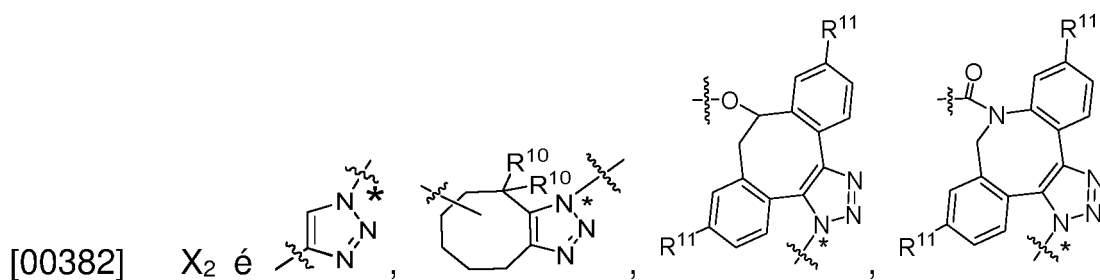
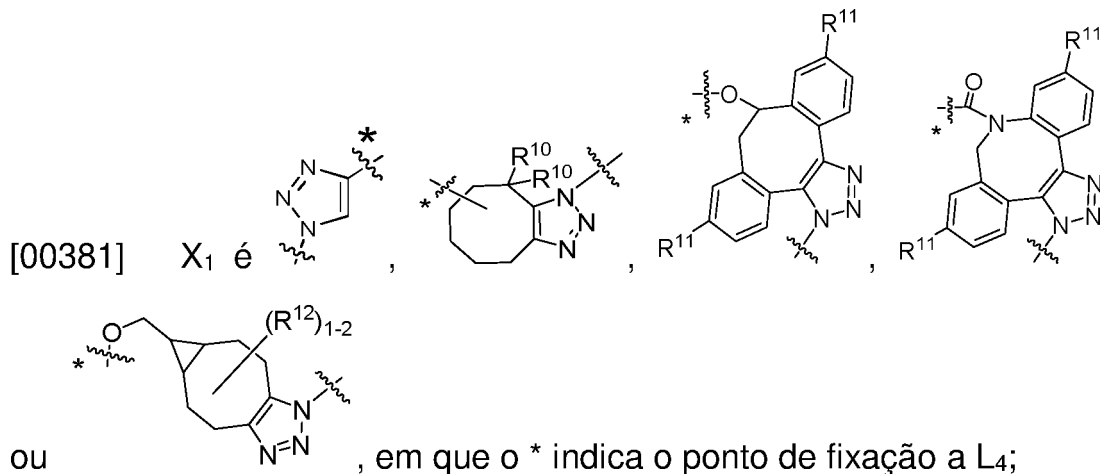
[00376] R⁵ é H, -CH₃ ou -CD₃;

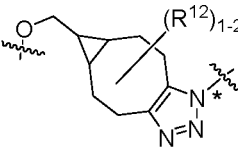
[00377] R⁶ é -NH₂ ou -OH;

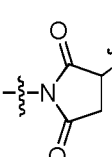
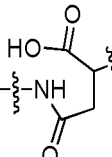
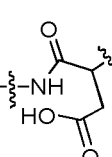
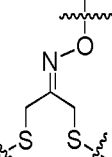
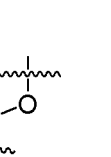
[00378] L₄₀ é -L₆R⁴⁰;

[00379] L₆ é -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻,
-L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -L₄NHC(=O)NH
((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_m⁻,
-(CH₂)_mX₁(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻,
-(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
-((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m, -((CH₂)_mO)_pCH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
-(CH₂)_mC(R₇)₂⁻ ou -(CH₂)_mC(R₇)₂SS(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻;

[00380] L₄ é -((CH₂)_m;



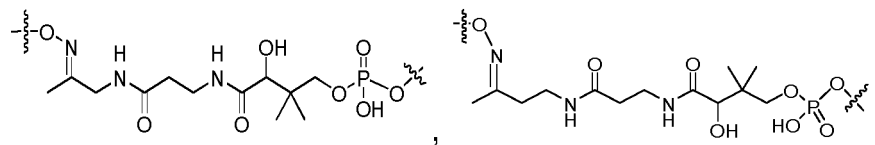
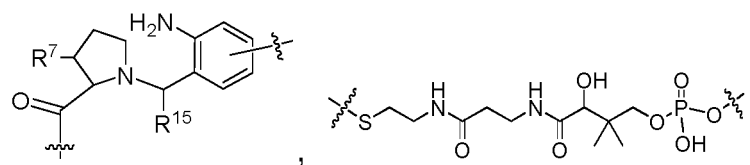
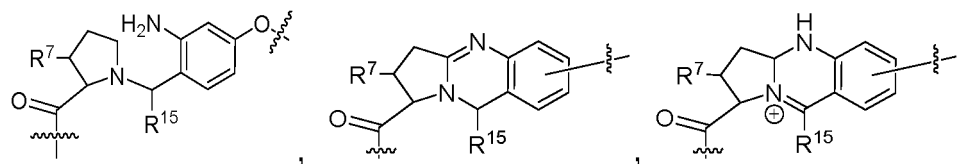
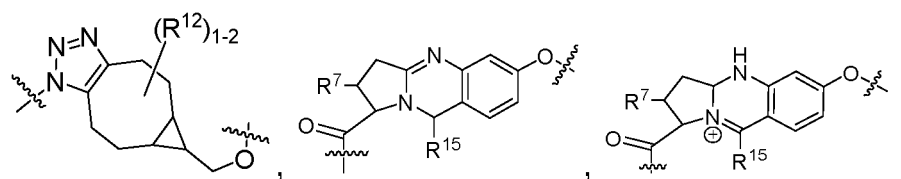
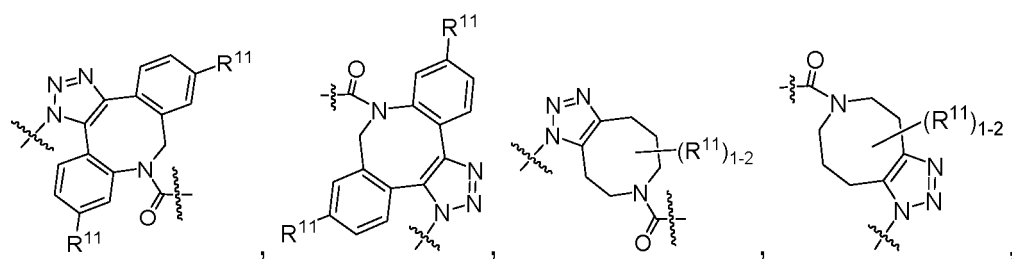
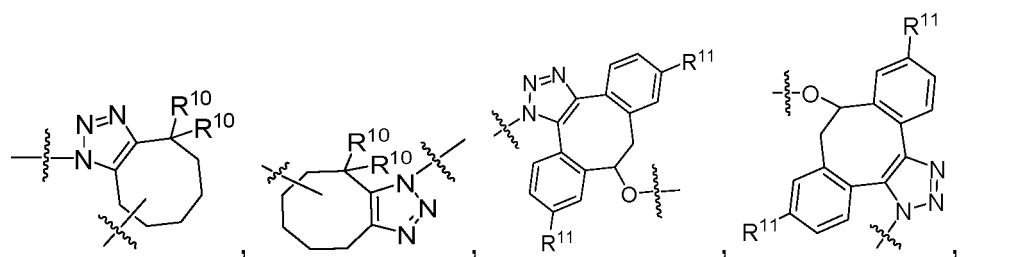
ou , em que o * indica ponto de fixação a L4;

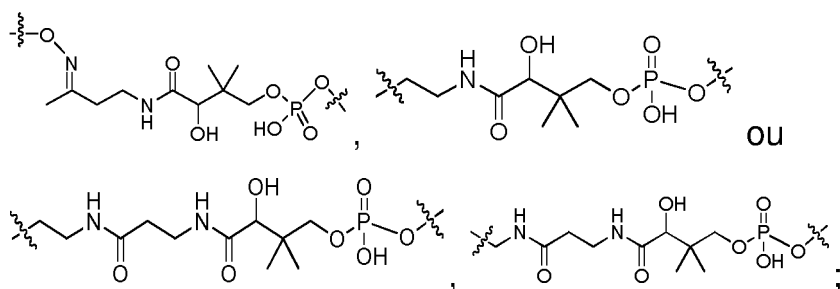
[00383] R^{40} é , , , , ,

-NR⁷C(=O)CH₂-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-,

-(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷C(=O)CH₂CH₂-,

-NH-, -C(=O)-, -NHC(=O)-, -CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-, -S-,





[00384] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00385] cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl e -OH;

[00386] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, - NH_2 , - OCH_3 , - OCH_2CH_3 , - $N(CH_3)_2$, -CN, - NO_2 e -OH;

[00387] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por - $C(=O)OH$, benzila substituída por - $C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por - $C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por - $C(=O)OH$;

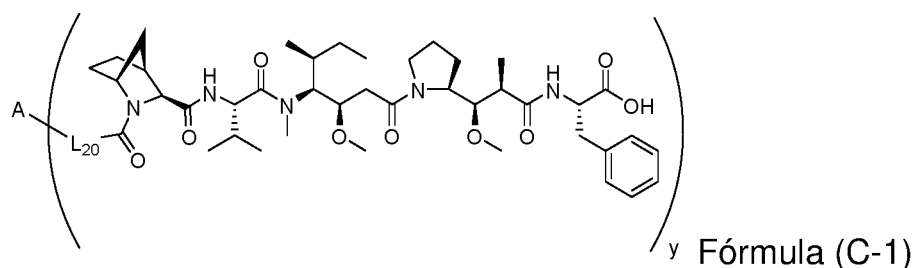
[00388] cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, - CH_3 e fenila;

[00389] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00390] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00391] Determinados aspectos e exemplos dos conjugados da invenção são fornecidos na seguinte listagem de modalidades adicionais enumeradas. Será reconhecido que os recursos especificados em cada modalidade podem ser combinados com outros recursos especificados para fornecer modalidades adicionais da presente invenção.

[00392] Modalidade 15. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C) é um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C-1):



[00393] em que: A, y e L_{20} são conforme definidos acima.

[00394] Modalidade 16. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C) ou Fórmula (C-1), em que:

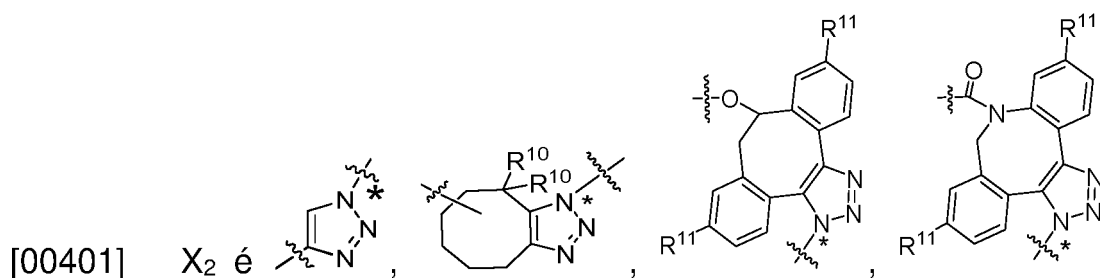
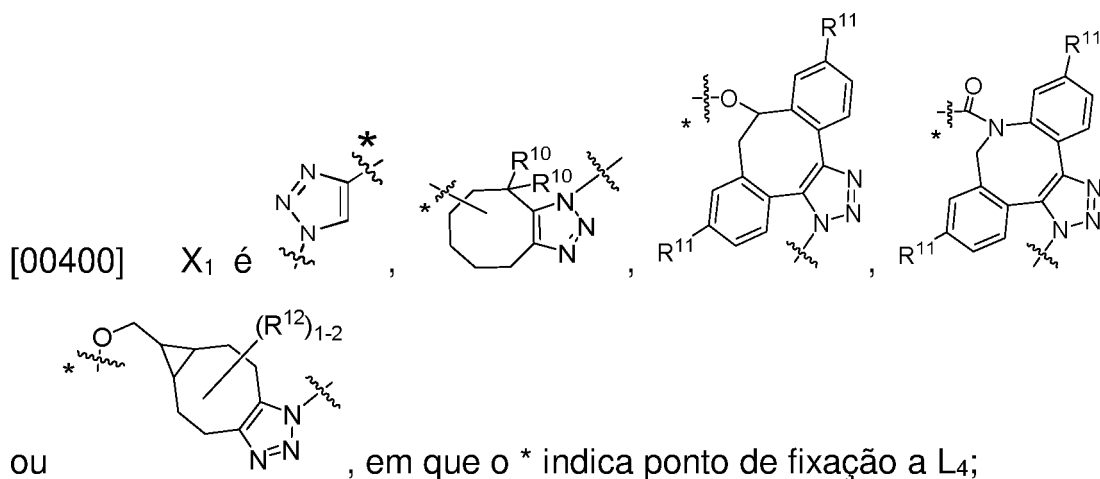
[00395] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

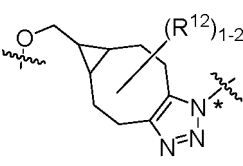
[00396] y é um número inteiro de 1 a 10;

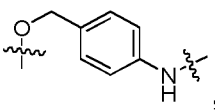
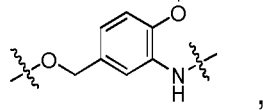
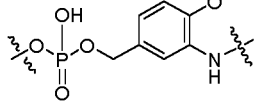
[00397] L_{20} é $-L_1R^{40}$;

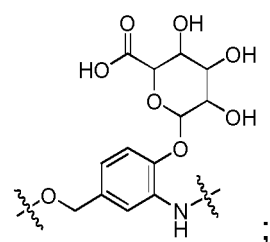
[00398] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$,
 $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

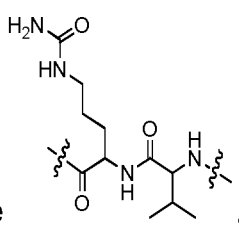
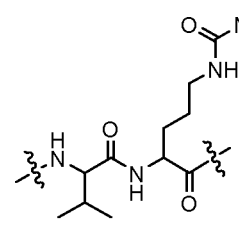
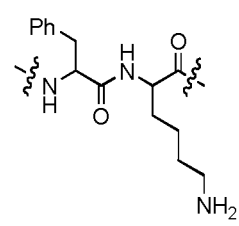
[00399] L_4 é $-((CH_2)_m$;

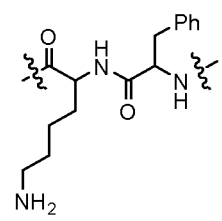
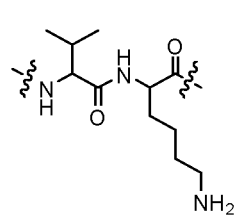
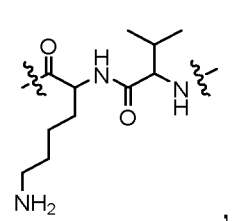
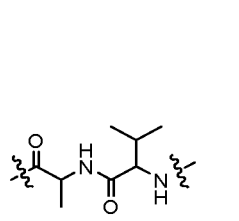
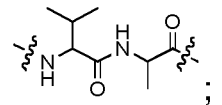


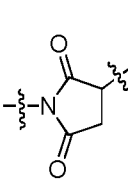
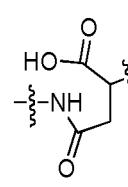
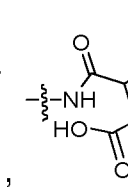
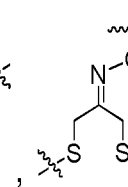
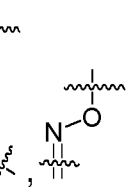
ou , em que o * indica ponto de fixação a L4;

[00402] X_3 é , ,  ou



[00403] X_4 é , , ,

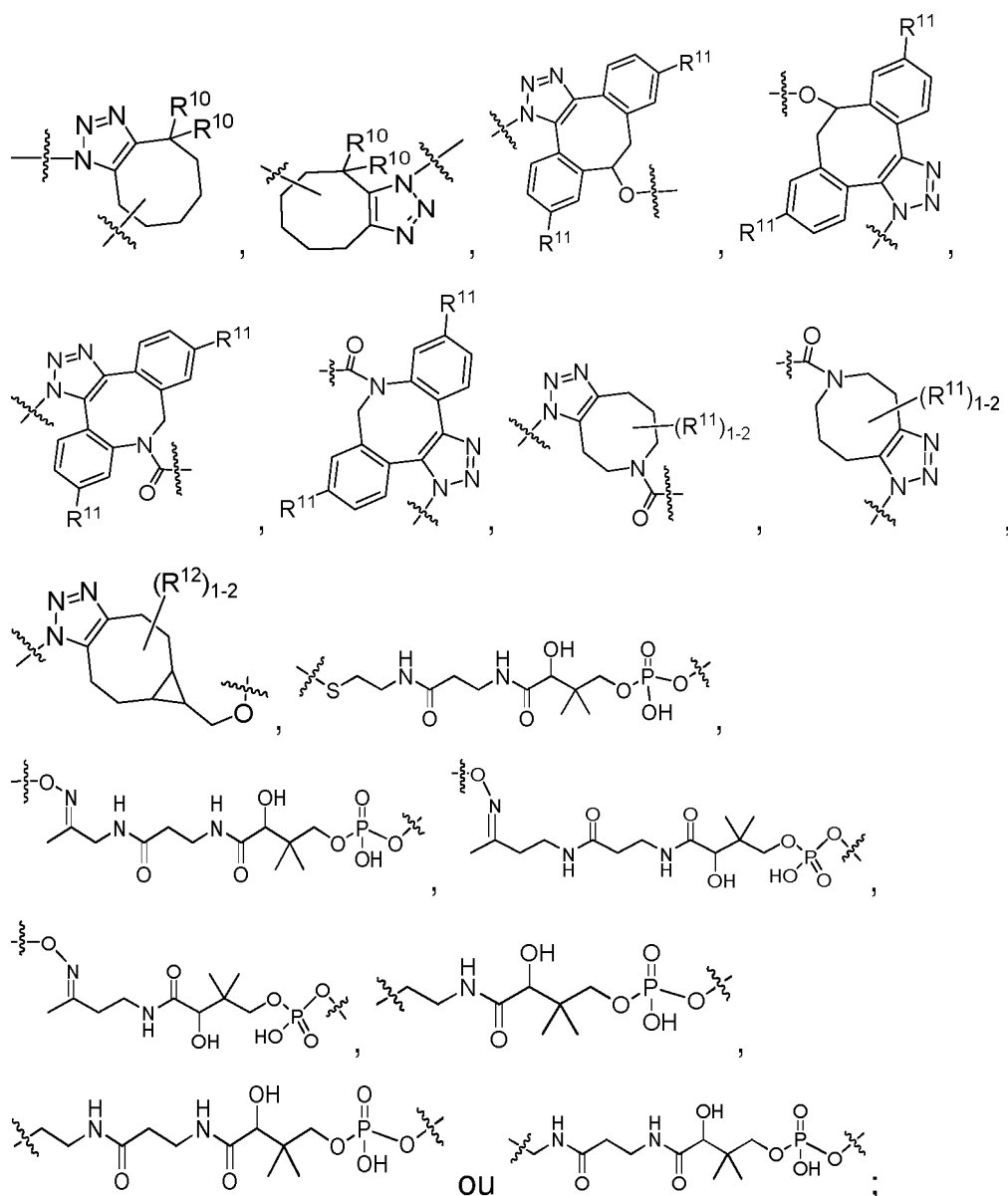
, , ,  ou  ;

[00404] R^{40} é , , , , ,

-NR⁷C(=O)CH₂-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-,

-(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷C(=O)CH₂CH₂-,

-NH-, -C(=O)-, -NHC(=O)-, -CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-, -S-,



[00405] cada R⁷ é independentemente selecionado de H e C₁-C₆ alquila;

[00406] cada R¹⁰ é independentemente selecionado dentre H, C₁-C₆ alquila, F, Cl e -OH;

[00407] cada R¹¹ é independentemente selecionado dentre H, C₁-C₆ alquila, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ e -OH;

[00408] cada R¹² é independentemente selecionado dentre H, C₁₋₆ alquila, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C₁₋₄alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄ alquila substituída por -C(=O)OH;

[00409] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00410] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00411] Modalidade 17. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C) ou Fórmula (C-1), em que:

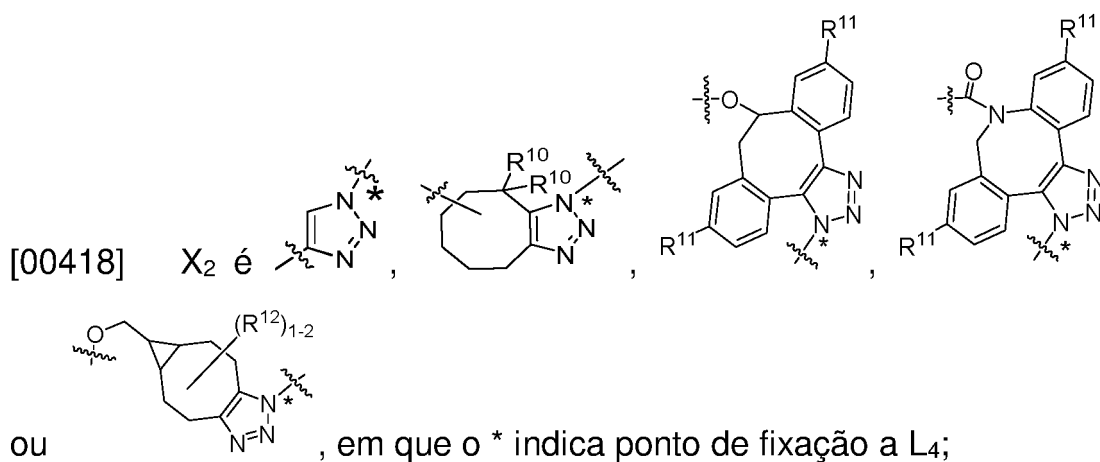
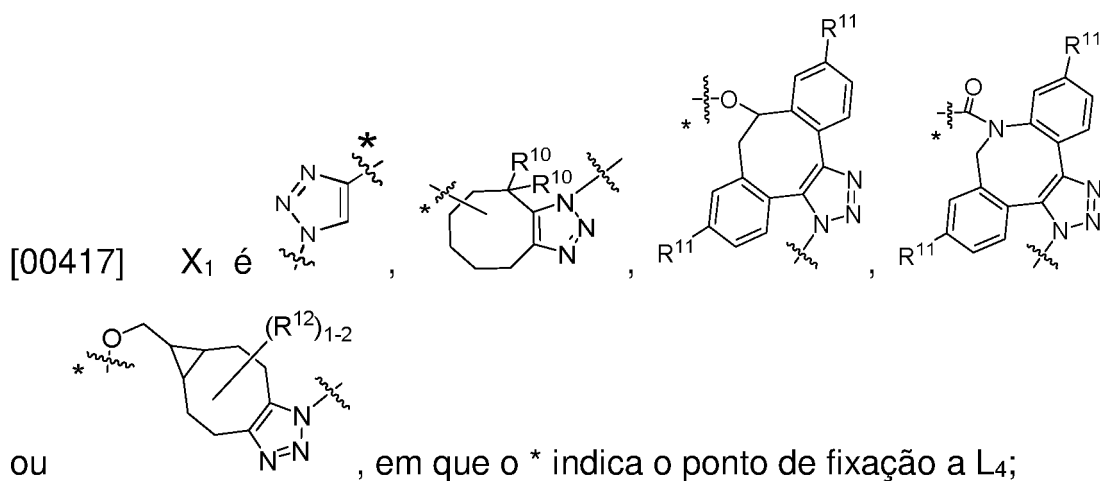
[00412] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

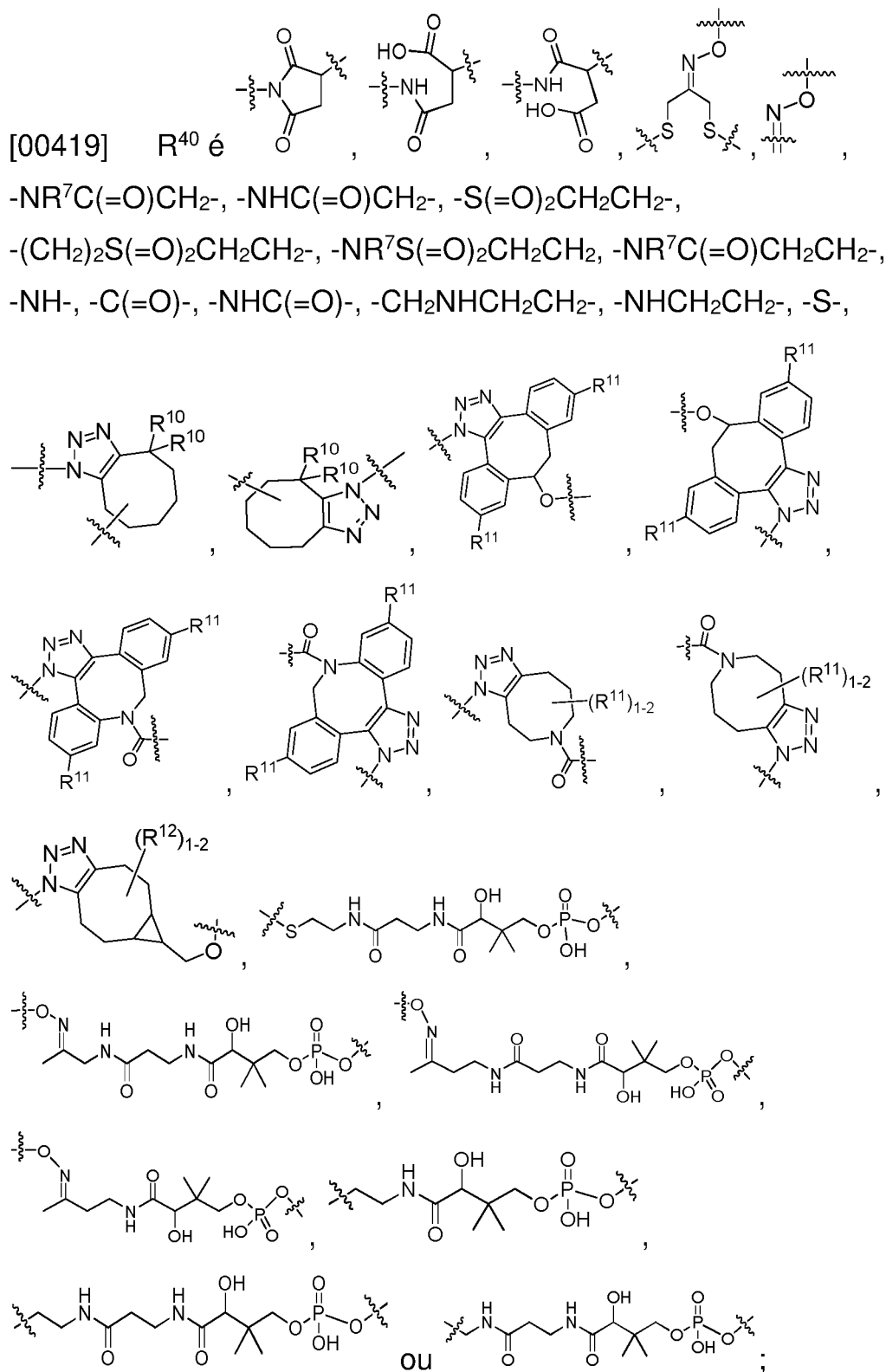
[00413] y é um número inteiro de 1 a 10;

[00414] L_{20} é $-L_1R^{40}$;

[00415] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ ou $-(CH_2)_m-$;

[00416] L_4 é $-((CH_2)_m$;





[00420] cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

[00421] cada R¹⁰ é independentemente selecionado dentre H, C₁-C₆ alquila, F, Cl e -OH;

[00422] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e $-OH$;

[00423] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00424] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00425] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00426] Modalidade 18. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (C) ou Fórmula (C-1), em que:

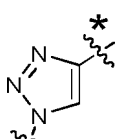
[00427] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

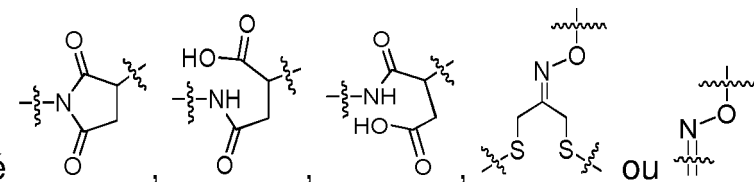
[00428] y é um número inteiro de 1 a 10;

[00429] L_{20} é $-L_1R^{40}$;

[00430] L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ ou $-(CH_2)_m-$;

[00431] L_4 é $-((CH_2)_m$;

[00432] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

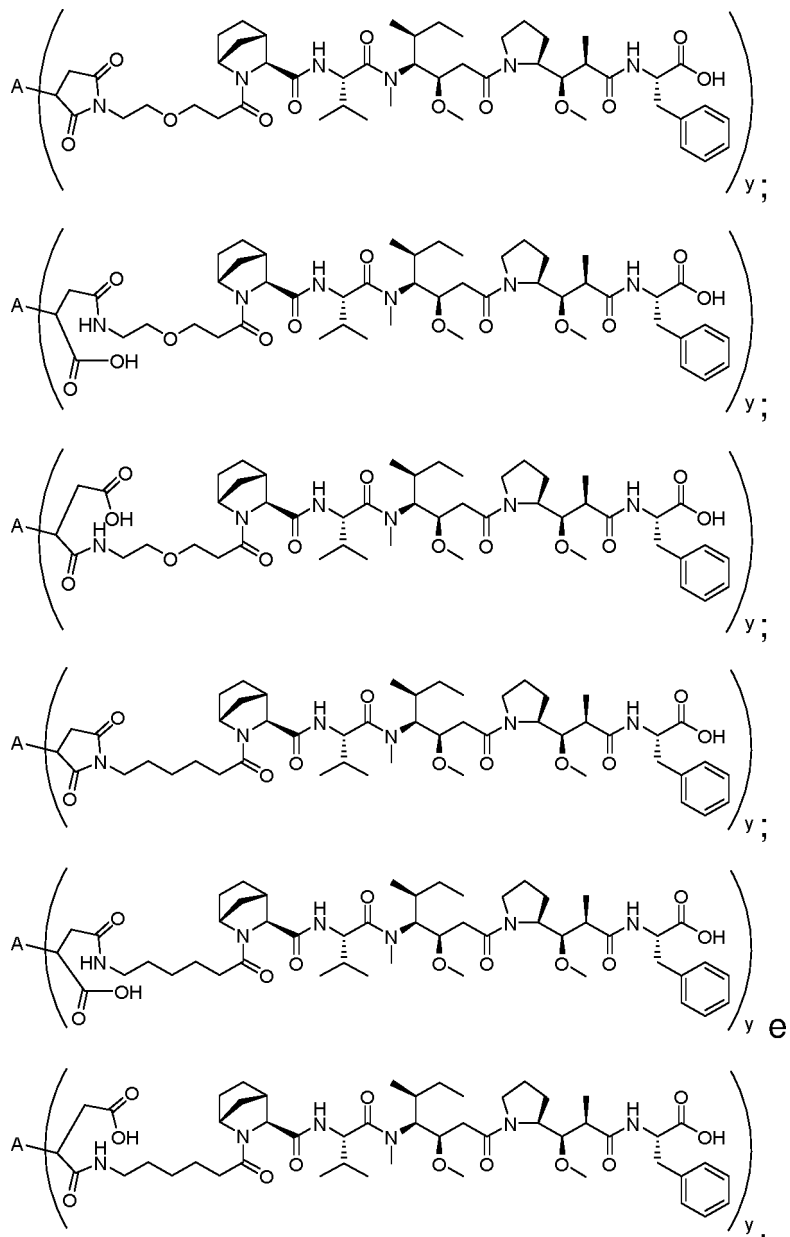
[00433] R^{40} é ;

[00434] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

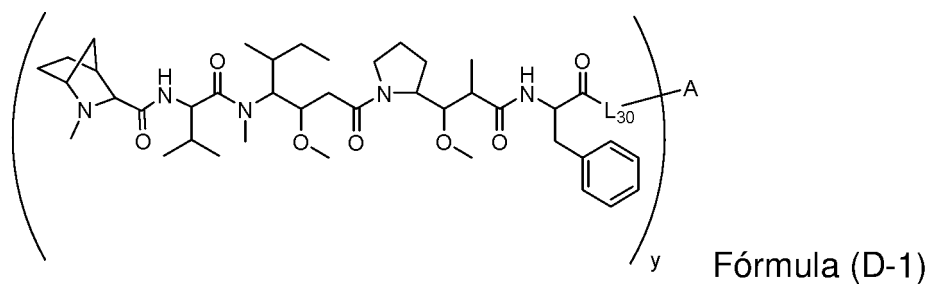
[00435] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

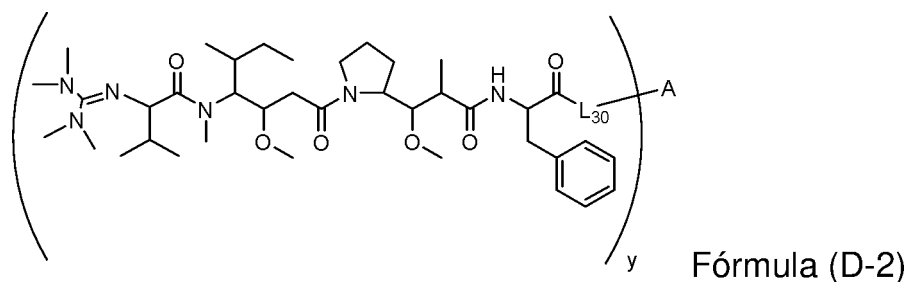
[00436] Modalidade 19. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula

la (C) ou Fórmula (C-1) selecionada dentre:



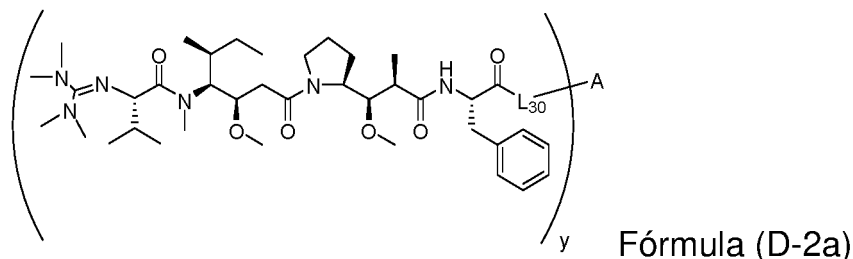
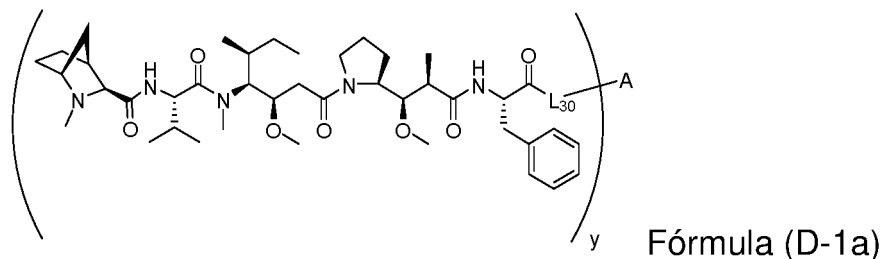
[00437] Modalidade 20. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D) é um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D-1) ou Fórmula (D-2):





[00438] em que: A, y e L₃₀ são conforme definidos acima.

[00439] Modalidade 21. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D) é um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D-1a) ou Fórmula (D-2a):



[00440] em que: A, y e L₃₀ são conforme definidos acima.

[00441] Modalidade 22. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) ou Fórmula (D-2a), em que:

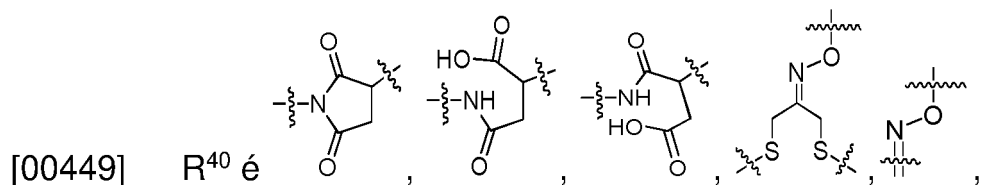
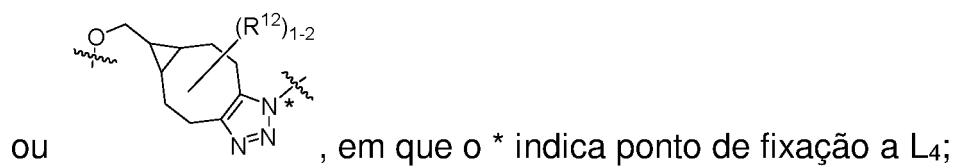
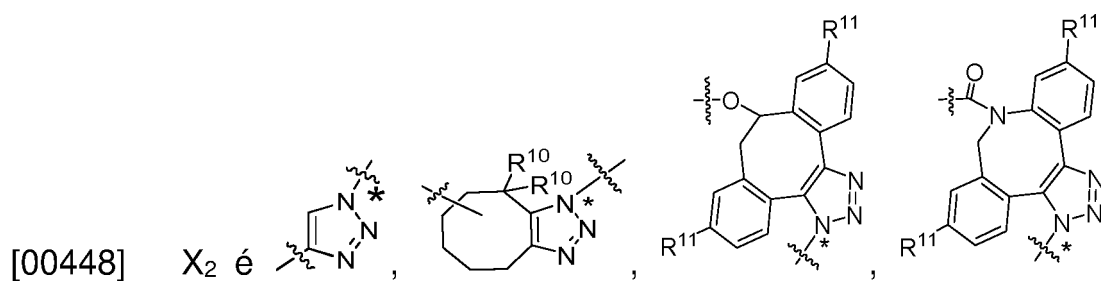
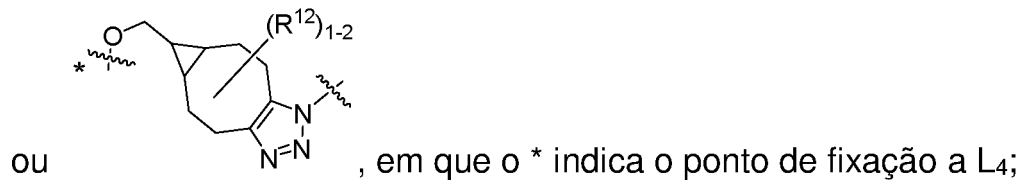
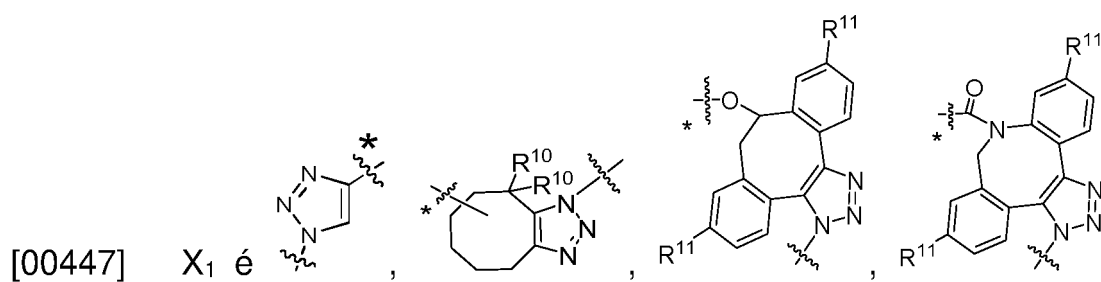
[00442] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00443] y é um número inteiro de 1 a 10;

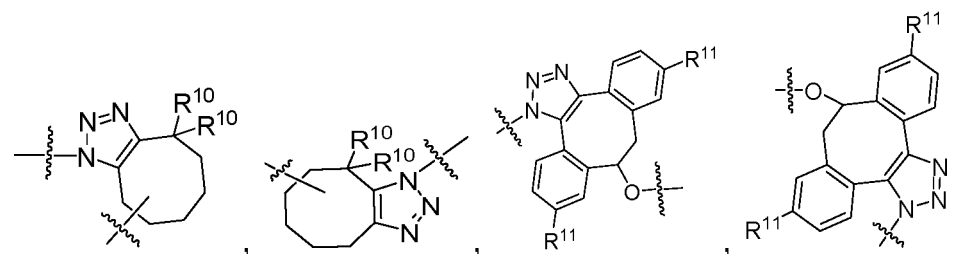
[00444] L₃₀ é -L₅R⁴⁰;

[00445] L₄ é -((CH₂)_m);

[00446] L₅ é -NHS(=O)₂(CH₂)_mX₁L₄, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻, -NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻ ou -NH(CH₂)_m⁻;



-NR⁷C(=O)CH₂-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-,
 -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷S(=O)₂CH₂CH₂-, -NR⁷C(=O)CH₂CH₂-,
 -NH-, -C(=O)-, -NHC(=O)-, -CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-, -S-,



[00456] Modalidade 23. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) ou Fórmula (D-2a):

[00457] em que:

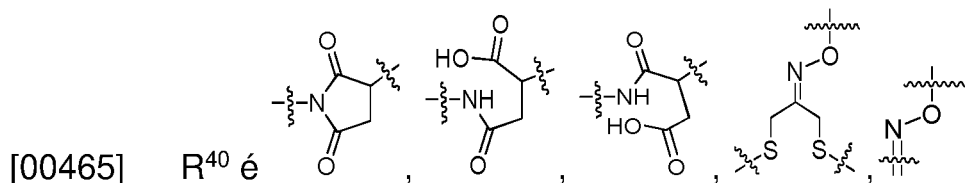
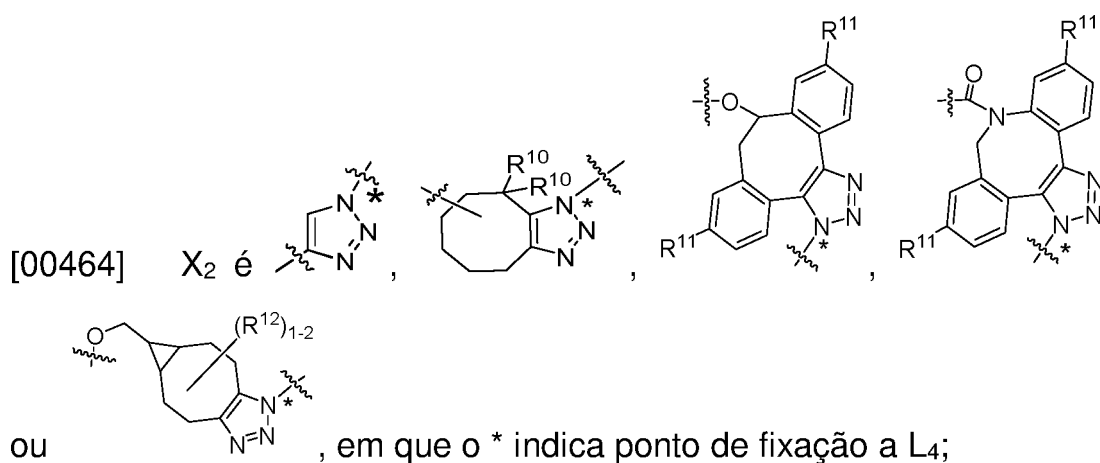
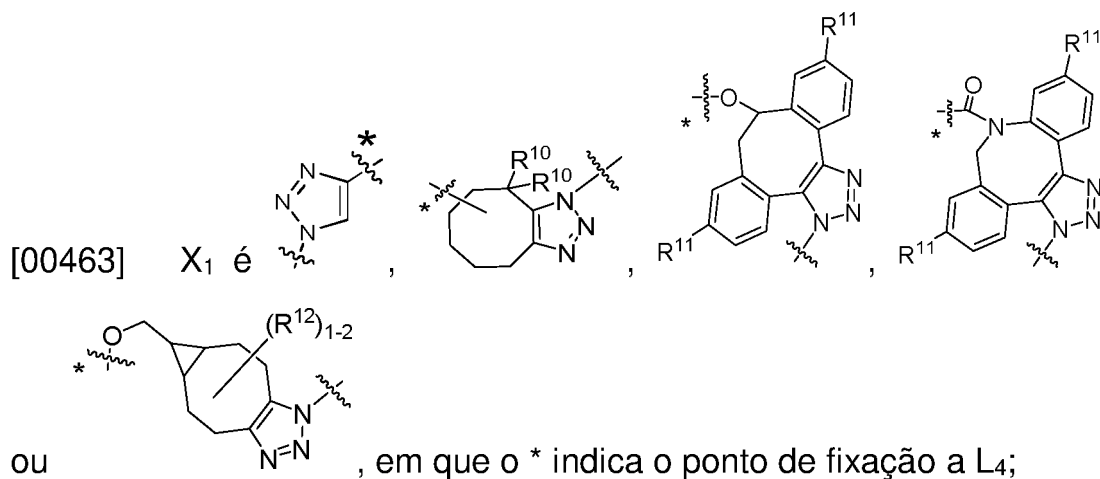
[00458] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00459] y é um número inteiro de 1 a 10;

[00460] L_{30} é $-L_5R^{40}$;

[00461] L_4 é $-((CH_2)_m$;

[00462] L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$ ou $-NH(CH_2)_m^-$;



alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por

$-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00470] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00471] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00472] Modalidade 24. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) ou Fórmula (D-2a), em que:

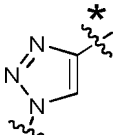
[00473] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

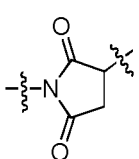
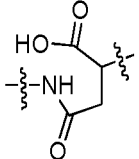
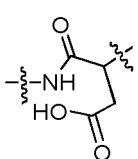
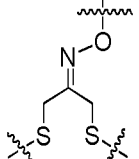
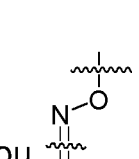
[00474] y é um número inteiro de 1 a 10;

[00475] L_{30} é $-L_5R^{40}$;

[00476] L_4 é $-((CH_2)_m)$;

[00477] L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$;

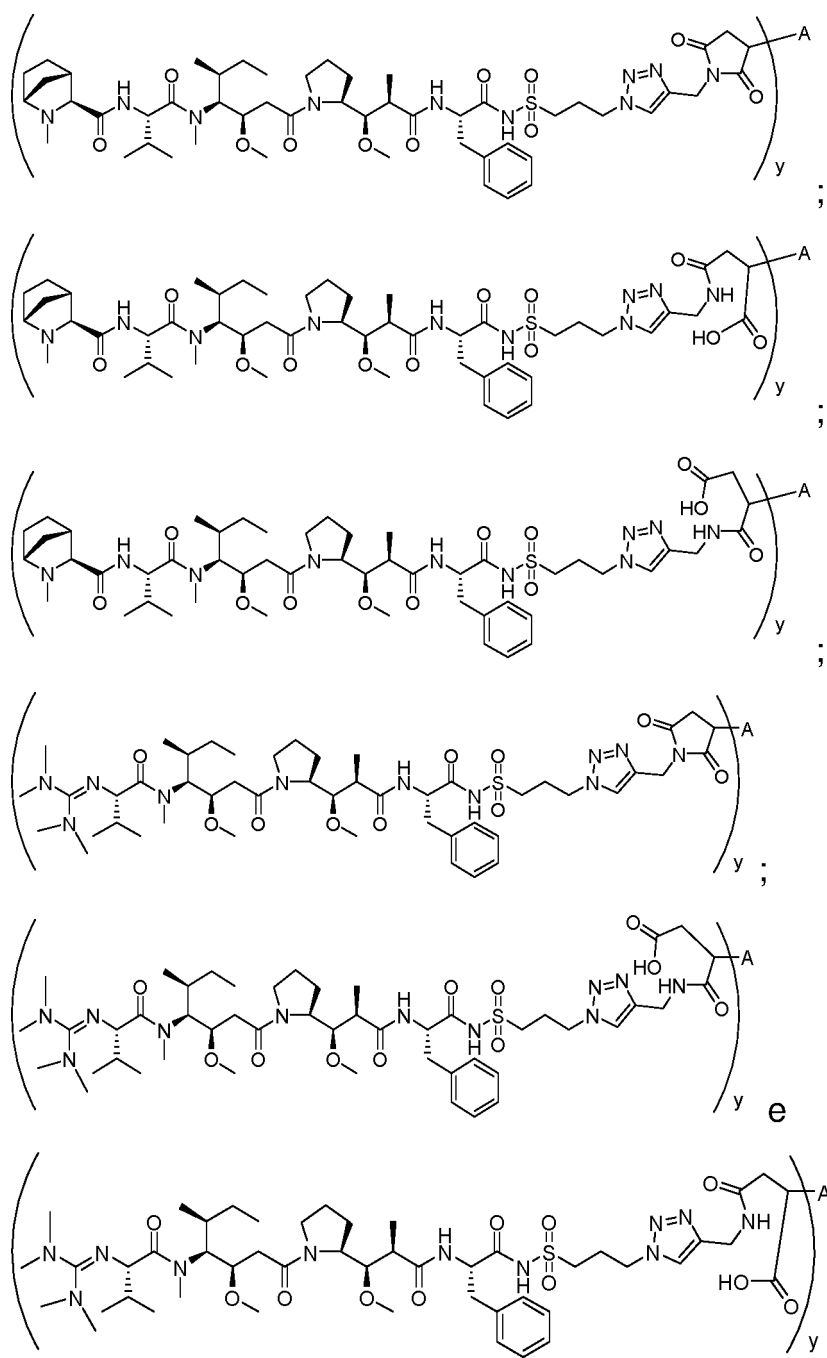
[00478] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

[00479] R^{40} é , , ,  ou  ;

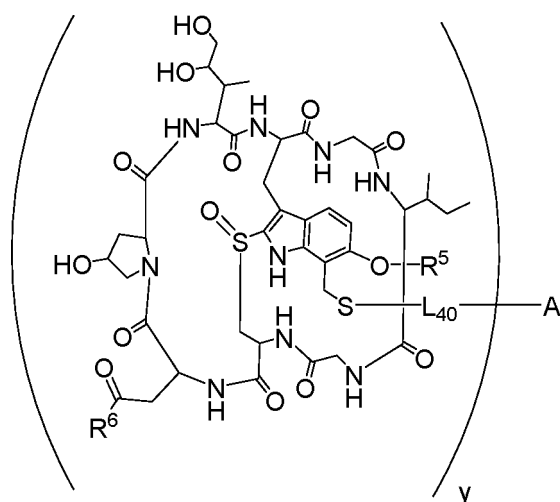
[00480] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00481] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00482] Modalidade 25. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) ou Fórmula (D-2a) selecionada dentre:



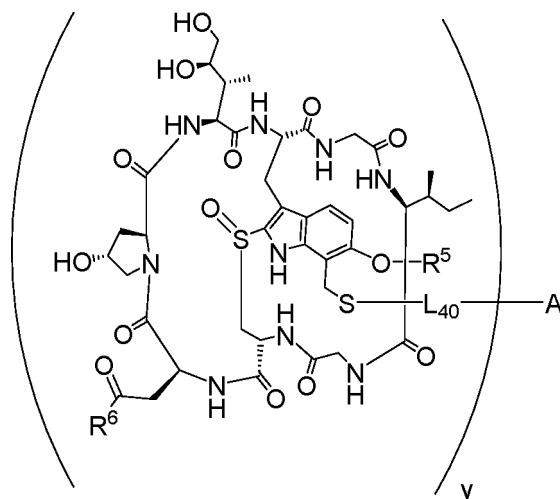
[00483] Modalidade 26. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E) é um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E-1):



Fórmula (E-1)

[00484] em que: A, y, R⁵, R⁶ e L₄₀ são conforme definidos acima.

[00485] Modalidade 27. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E) é um conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E-1a):



Fórmula (E-1a)

[00486] em que: A, y, R⁵, R⁶ e L₄₀ são conforme definidos acima.

[00487] Modalidade 28. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) ou Fórmula (E-1a), em que:

[00488] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00489] y é um número inteiro de 1 a 10;

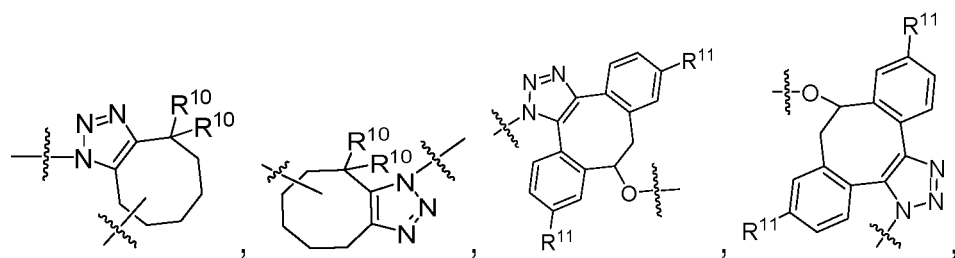
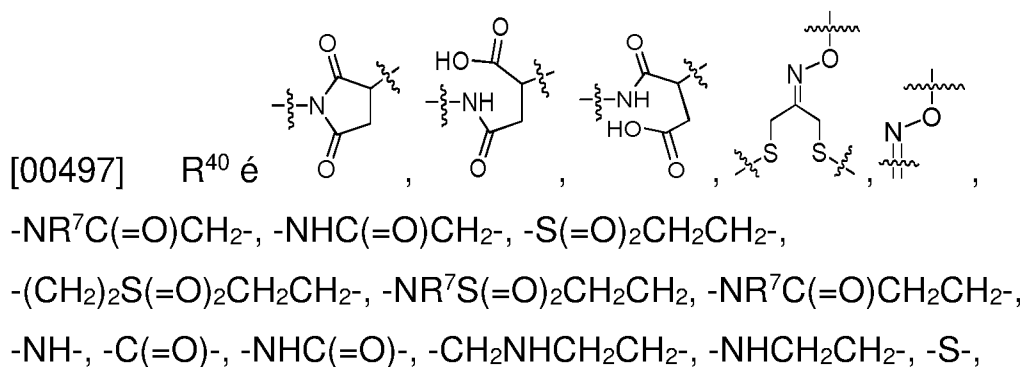
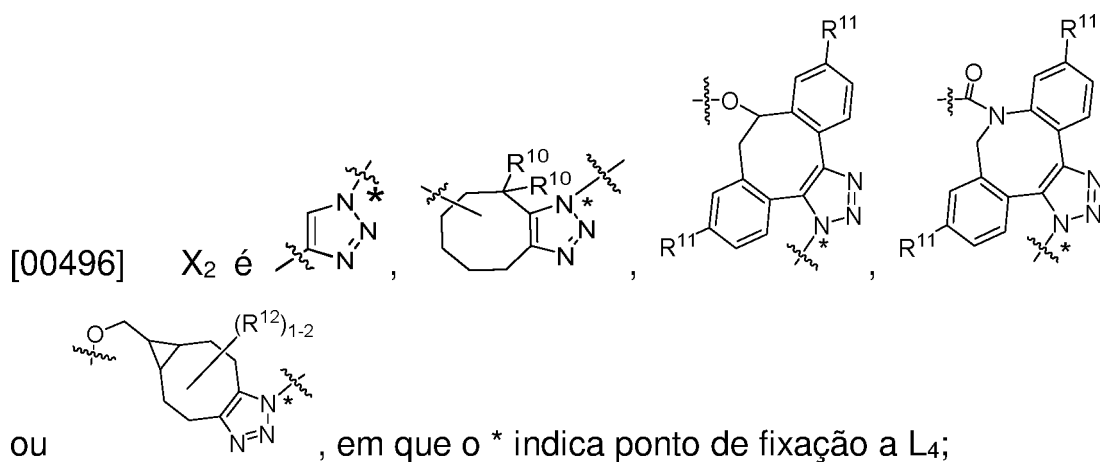
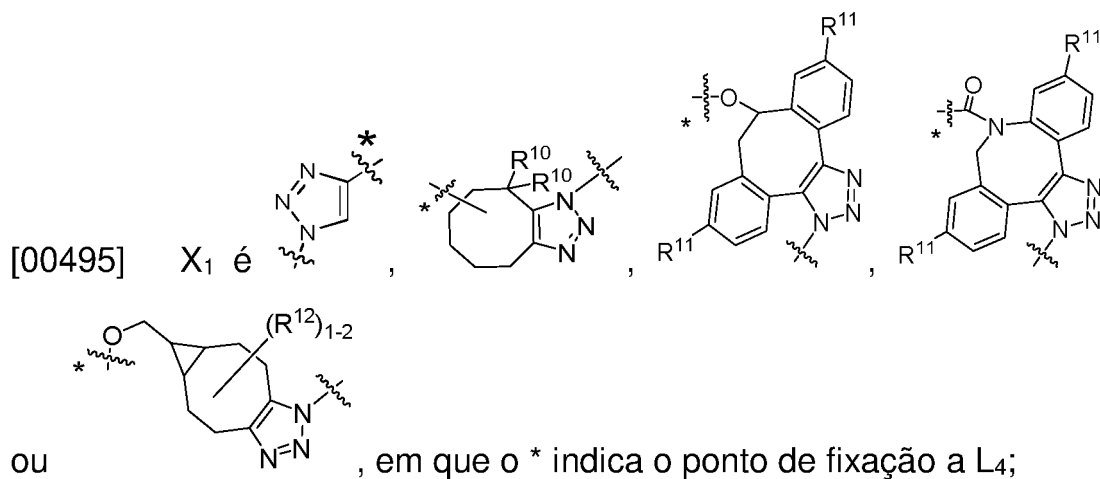
[00490] R⁵ é H, -CH₃ ou -CD₃;

[00491] R⁶ é -NH₂ ou -OH;

[00492] L₄₀ é -L₆R⁴⁰;

[00493] L₆ é -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻,

-L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄-, -L₄NHC(=O)NH
 ((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄-, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m- ou -(CH₂)_m-;
 [00494] L₄ é -((CH₂)_m);



[00504] Modalidade 29. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) ou Fórmula (E-1a), em que:

[00505] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00506] y é um número inteiro de 1 a 10;

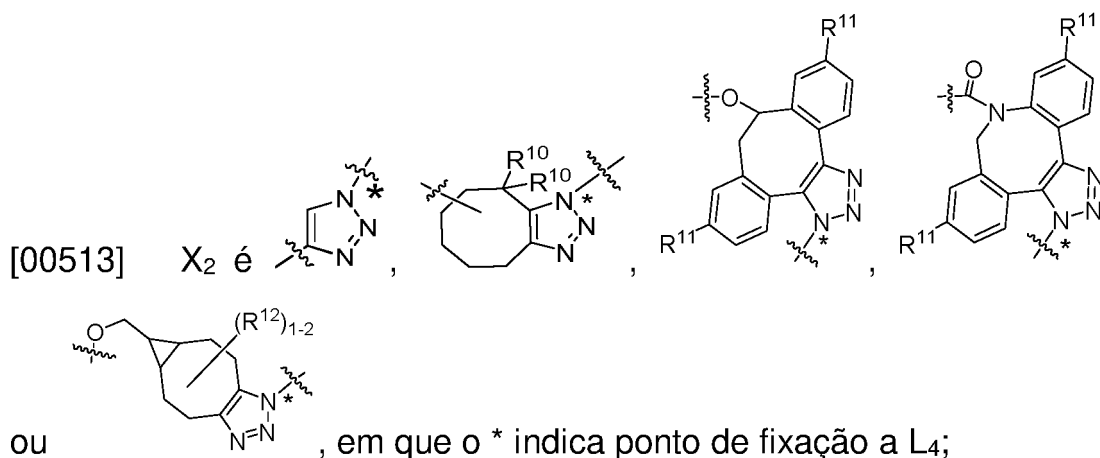
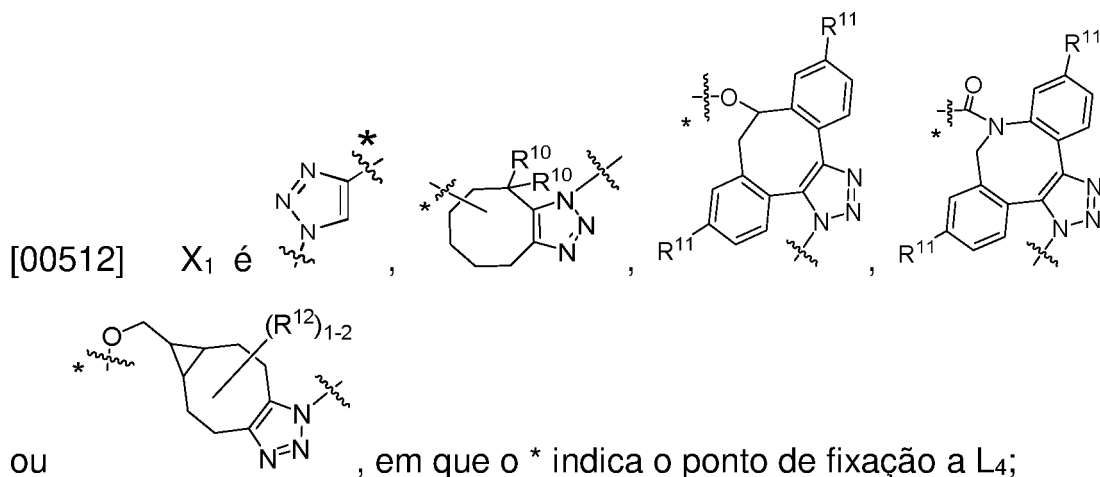
[00507] R^5 é H, $-CH_3$ ou $-CD_3$;

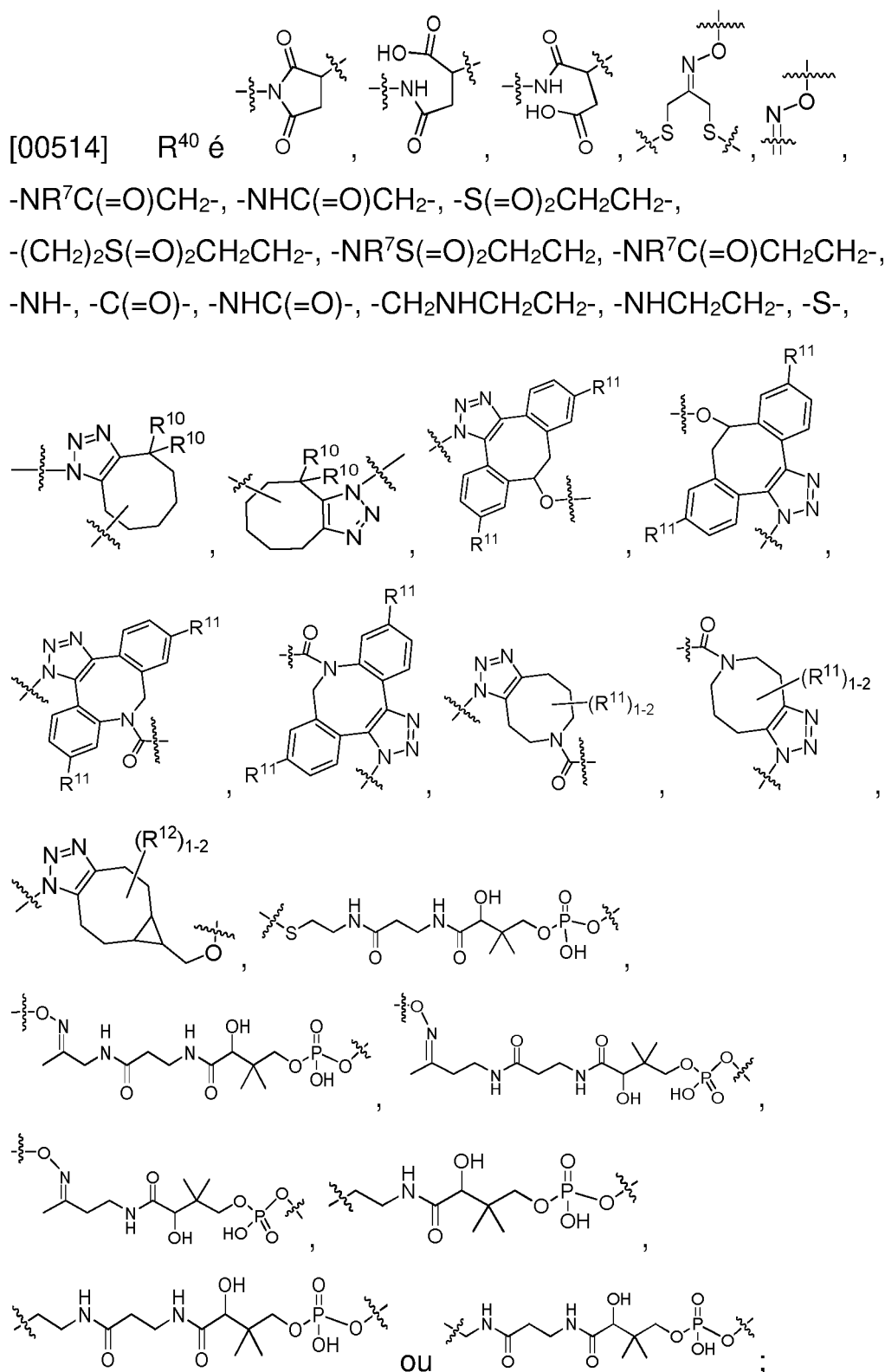
[00508] R^6 é $-NH_2$ ou $-OH$;

[00509] L_{40} é $-L_6R^{40}$;

[00510] L_6 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ ou $-(CH_2)_m-$;

[00511] L_4 é $-((CH_2)_m)$;





[00515] cada R⁷ é independentemente selecionado de H e C₁-C₆ alquila;

[00516] cada R¹⁰ é independentemente selecionado dentre H, C₁-C₆ alquila, F, Cl e -OH;

[00517] cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e $-OH$;

[00518] cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

[00519] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

[00520] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

[00521] Modalidade 30. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) ou Fórmula (E-1a), em que:

[00522] A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano;

[00523] y é um número inteiro de 1 a 10;

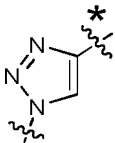
[00524] R^5 é $-CH_3$;

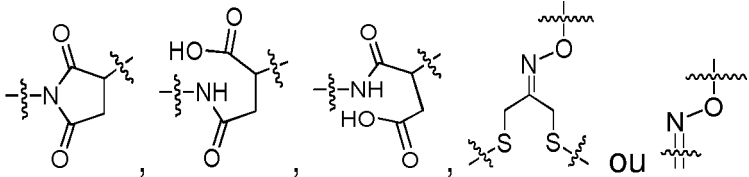
[00525] R^6 é $-NH_2$;

[00526] L_{40} é $-L_6R^{40}$;

[00527] L_6 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$ ou $-(CH_2)_m-$;

[00528] L_4 é $-((CH_2)_m)$;

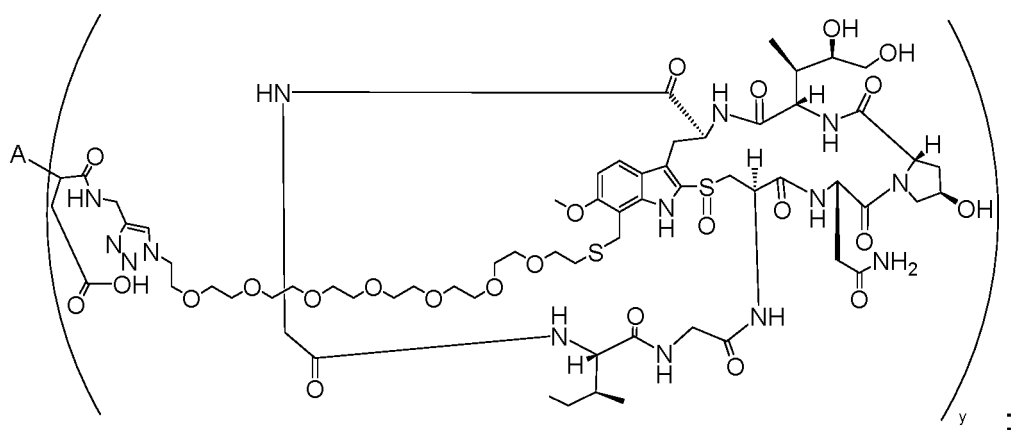
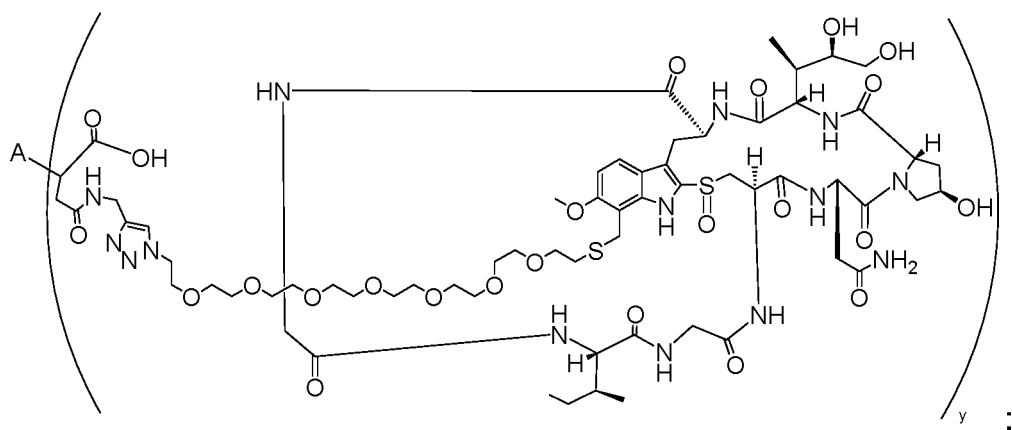
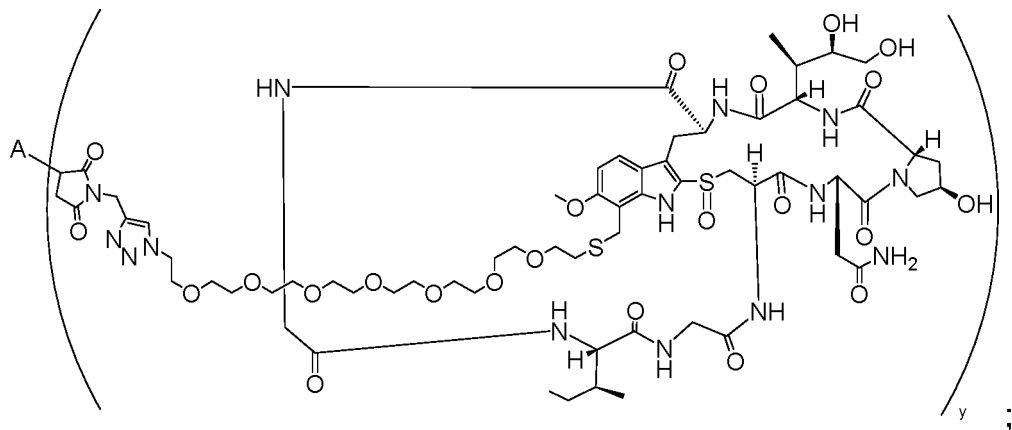
[00529] X_1 é , em que o * indica ponto de fixação a L_4 ;

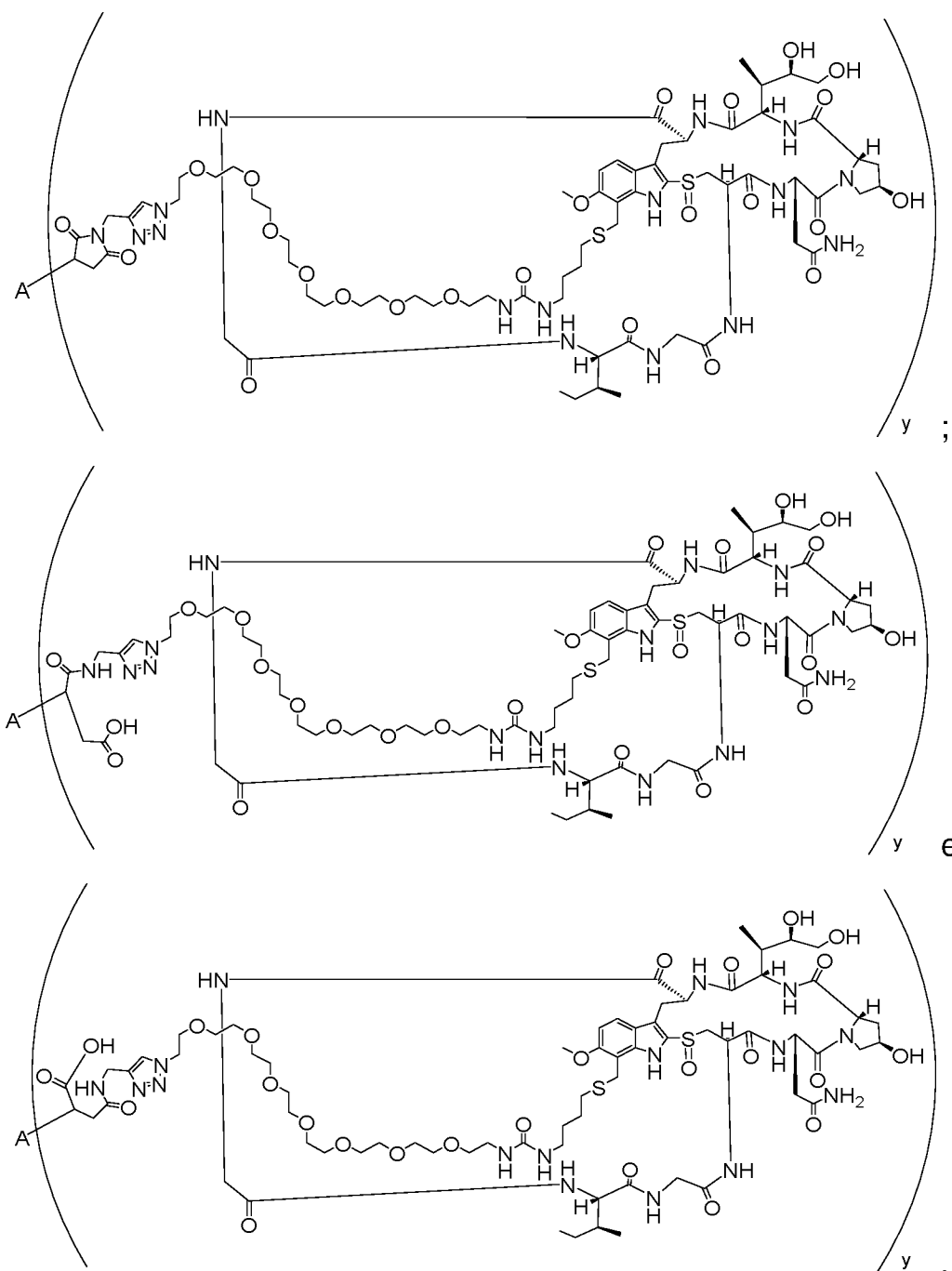
[00530] R^{40} é  ;

[00531] cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

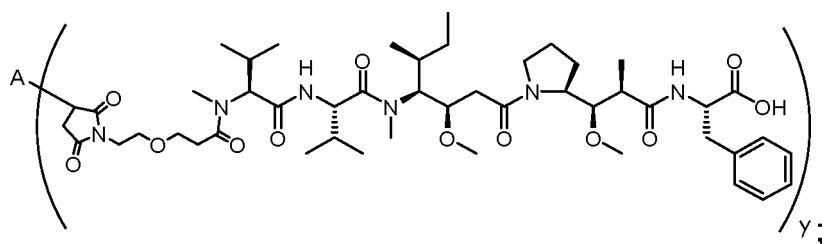
[00532] cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

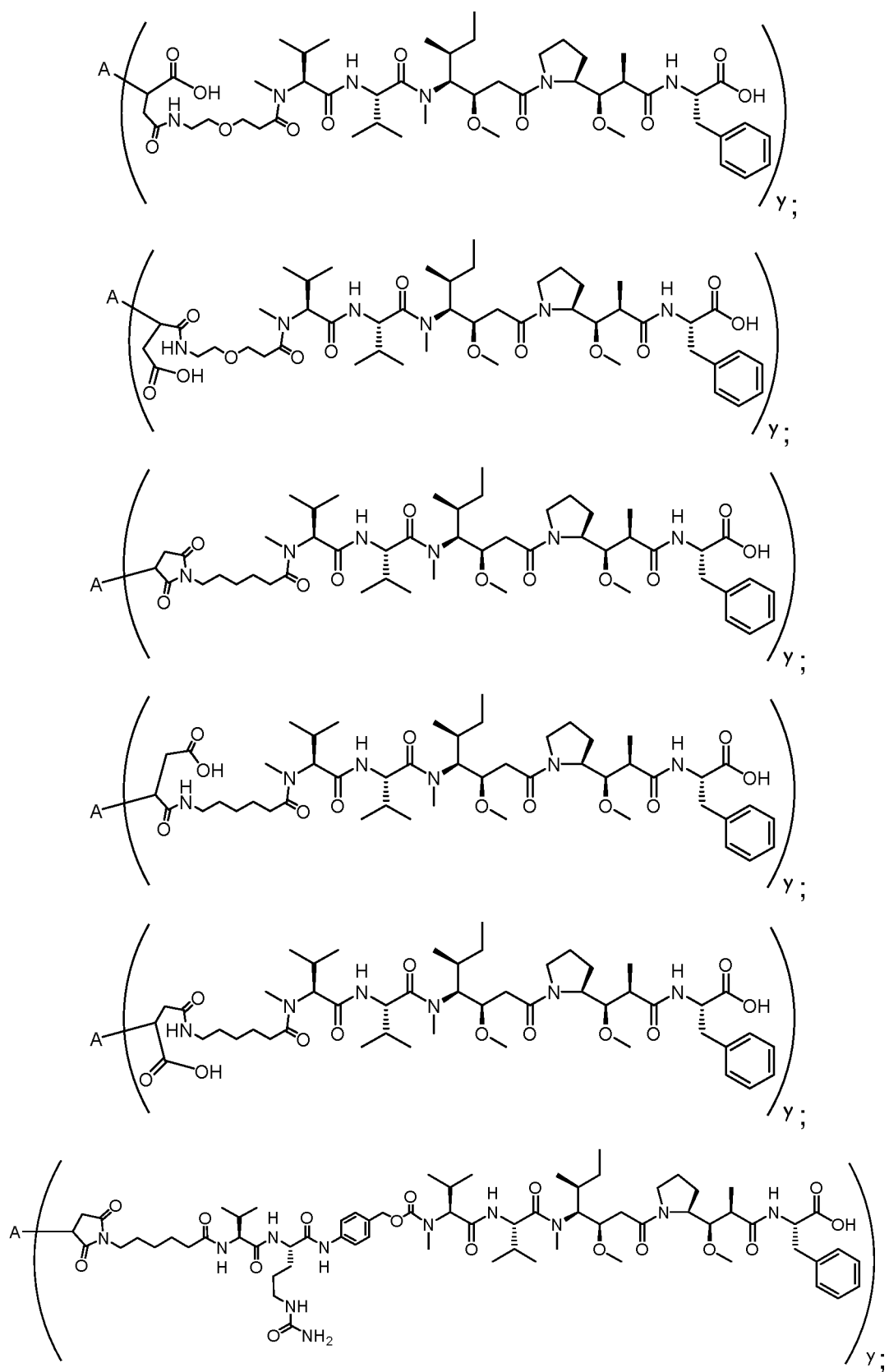
[00533] Modalidade 31. O conjugado que tem a estrutura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) ou Fórmula (E-1a) selecionada dentre:

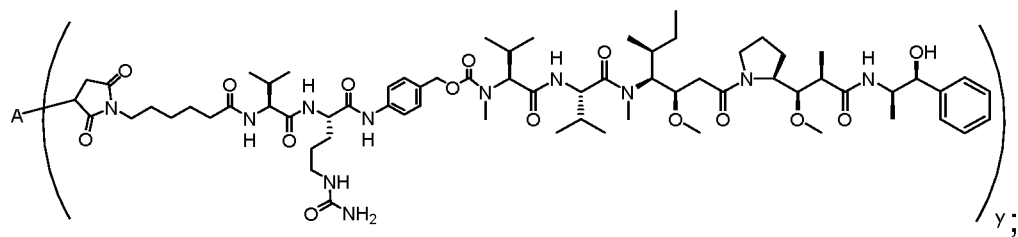
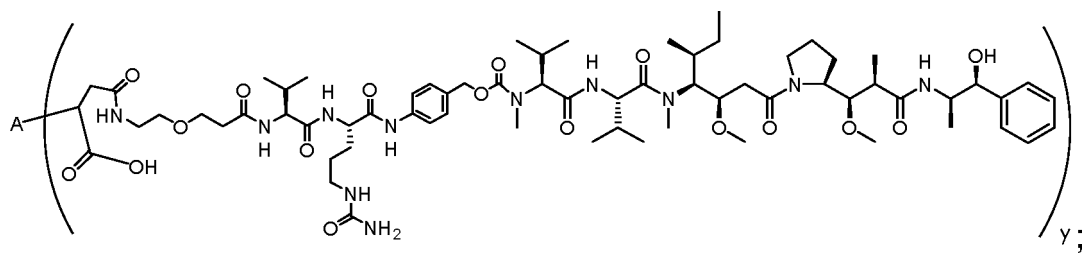
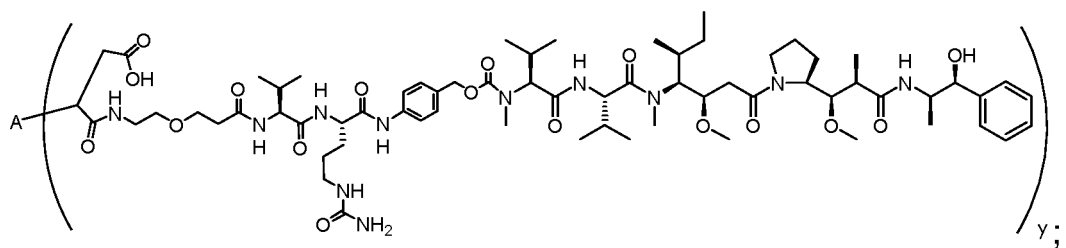
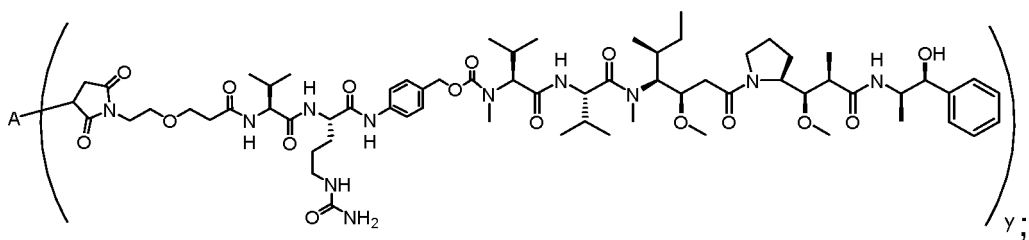
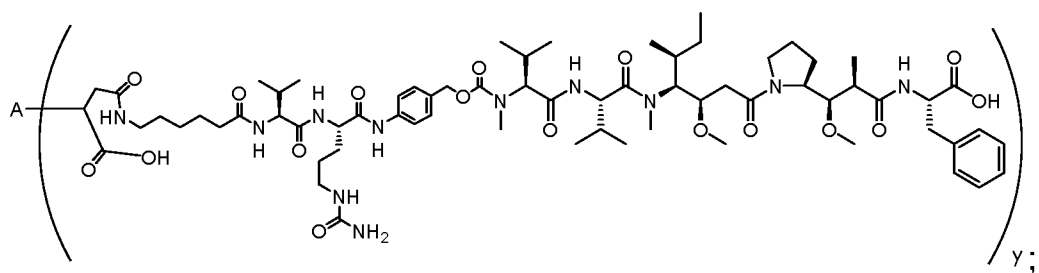
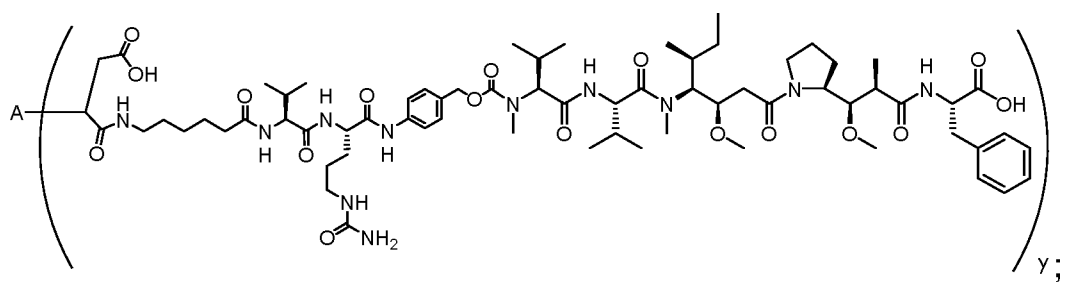


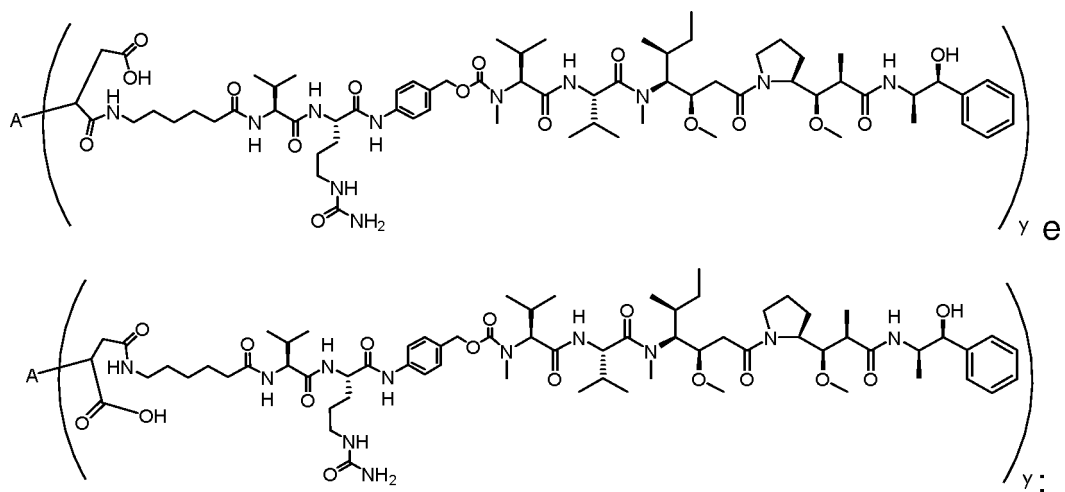


[00534] Em outro aspecto, o conjugado de anticorpo e fármaco da invenção é selecionado dentre:





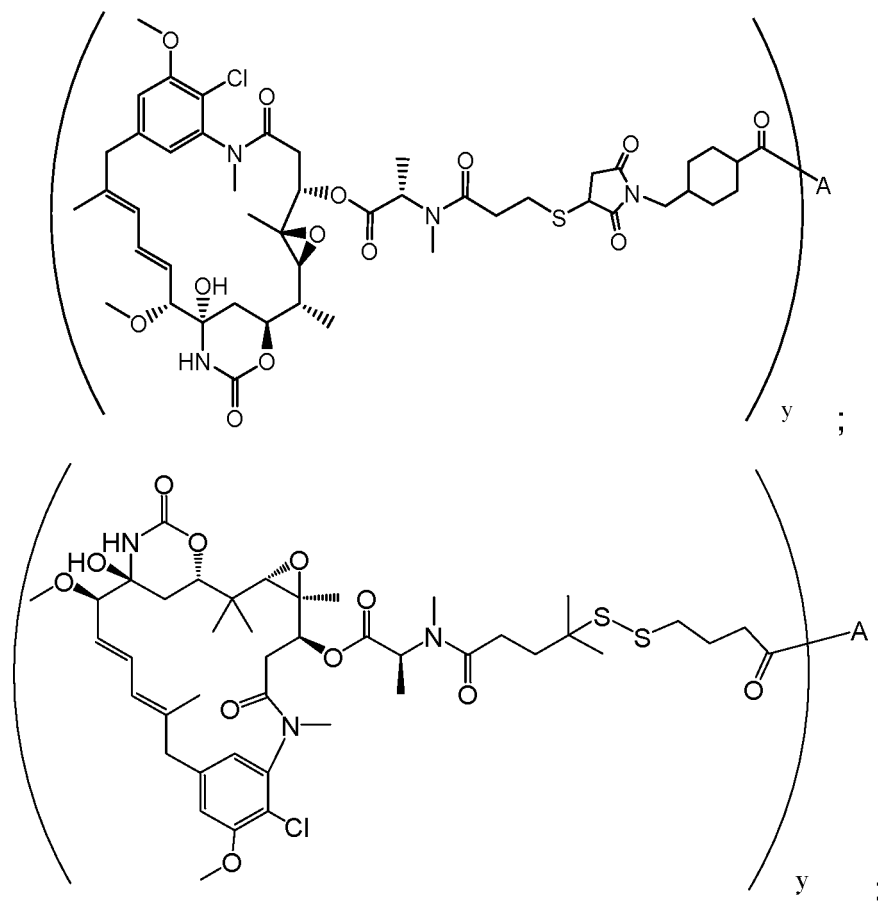


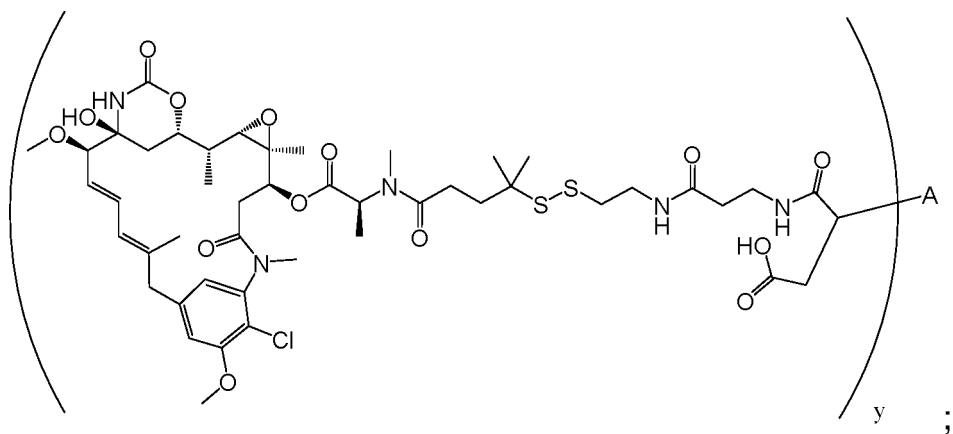
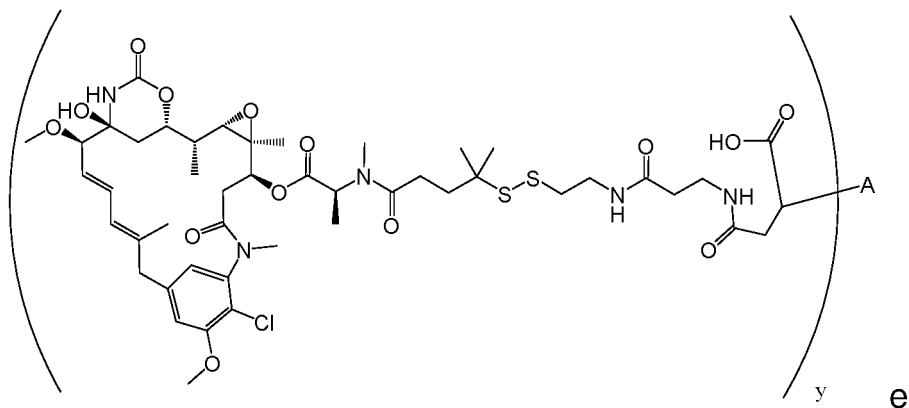
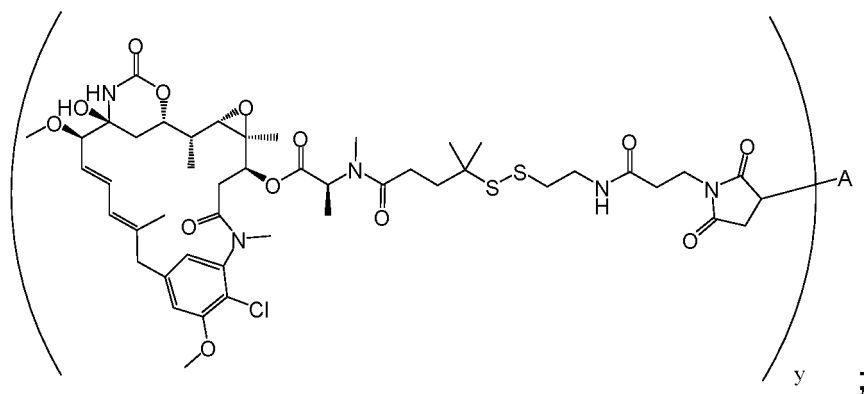
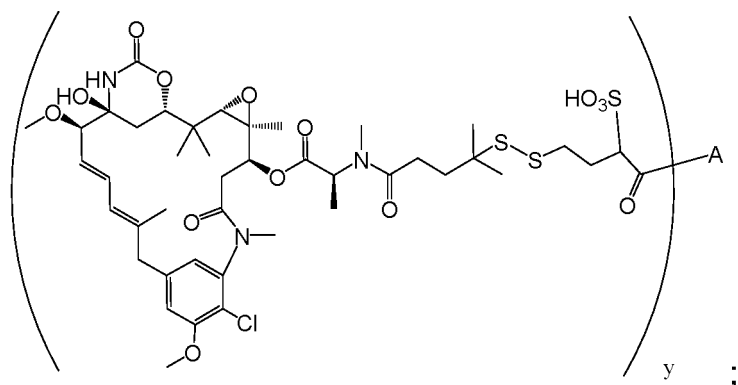


[00535] em que A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano,

[00536] e y é um número inteiro de 1 a 10.

[00537] Em outro aspecto, o conjugado de anticorpo e fármaco da invenção é selecionado dentre:



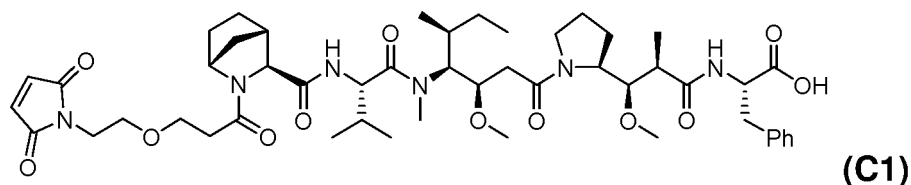


[00538] em que A representa um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano,

[00539] e y é um número inteiro de 1 a 10.

Síntese de Compostos de Ligante-Fármaco Exemplificativos

Exemplo 1: Síntese de ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(2-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)etóxi)propanoíl)-2-azabicclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetil-butanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoíl)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico **(C1)**



[00540] **Etapa 1:** A uma solução de BocVal-Dil-Dap-OH (1,00 g, 1,75 mmol) em N,N-dimetilformamida (DMF, 20,0 ml) a 0 °C foram adicionados N,N-di-isopropil etilamina (DIEA, 0,677 g, 5,25 mmol) e hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridínio (HATU) (0,731 g, 1,93 mmol). A solução resultante foi então agitada por 5 minutos e adicionada a uma solução de sal HCL de éster metílico de L-fenilalanina (0,377 g, 1,75 mmol) e DIEA (0,226 g, 1,75 mmol) em DMF (5,0 ml) a 0 °C. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente por 30 minutos adicionais e, então, concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC de fase reversa com o uso do sistema ISCO, coluna C18, eluído com 20 a 90% de acetonitrila-água para obter BocVal-Dil-Dap-PheOMe: MS *m/z* 733,4 (M+1); tempo de retenção 1,47 minuto.

[00541] **Etapa 2:** A uma solução de BocVal-Dil-Dap-PheOMe (0,683 g, 0,932 mmol) obtida na etapa 1 em metanol (20 ml), foi adicionado HCl (4 N em 1,4-dioxano, 16 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 7 horas e concentrada. O resíduo foi dissolvido em dioxano e liofilizado para obter sal HCl de Val-Dil-Dap-PheOMe: MS *m/z* 633,4 (M+1); tempo de retenção 0,96 minuto.

[00542] **Etapa 3:** Ácido (1R,3S,4S)-N-Boc-2-

azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (12,6 mg, 0,052 mmol) foi dissolvido em DMF (1 ml) em um frasco de fundo redondo de 15 ml. DIEA (12,3 mg, 0,095 mmol) e HATU (19 mg, 0,050 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada por 10 minutos e sal HCL de Val-Dil-Dap-PheOMe (30 mg, 0,090 mmol) em DMF (1,0 ml) foi adicionado. A mistura de reação foi agitada por 1 hora. A análise por LCMS indicou que a reação foi concluída, e a mistura resultante foi purificada por HPLC de fase reversa com o uso de coluna C18, eluído com 20 a 90% de acetonitrila-H₂O contendo 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). As frações contendo o produto desejado foram agrupadas e concentradas para obter 3-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metóxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metóxi-3-(((S)-1-metóxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de (1R,3S,4S)-terc-butila: MS *m/z* 856,6 (M+1); tempo de retenção 1,67 minuto.

[00543] **Etapla 4:** O produto obtido na etapa 3 foi dissolvido em diclorometano (DCM) (2,0 ml) e tratado com TFA (0,5 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A análise por LCMS mostrou que a reação foi concluída. A mistura de reação foi concentrada por evaporador giratório para gerar 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de (S)-metila como um sal TFA: MS *m/z* 756,6 (M+1); tempo de retenção 1,22 minuto.

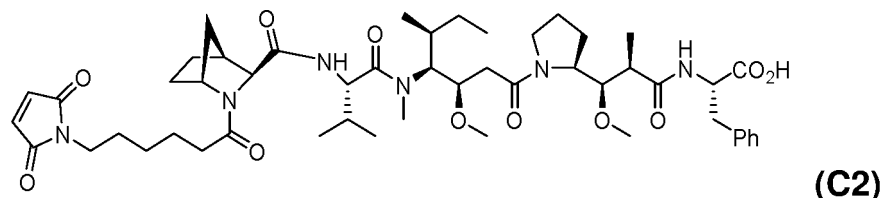
[00544] **Etapla 5:** Em um frasco de fundo redondo de 25 ml foram adicionados sal TFA de 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-

2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de (S)-metila (38,4 mg, 0,044 mmol), mono-hidrato de LiOH (50,0 mg, 1,19 mmol) e uma mistura de solventes de MeOH-H₂O (2:1, 4,0 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 60 horas. A análise de LC-MS indicou que a reação foi concluída. A mistura de reação foi concentrada e purificada por HPLC de fase reversa, coluna C18, eluída com acetonitrila-H₂O (10 a 70%) contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram combinadas e concentradas para gerar ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico como um sal TFA, MS *m/z* 742,5 (M+1). Tempo de retenção 1,15 minuto.

[00545] **Etapa 6:** A uma solução de ácido 3-(2-(maleimido)etóxi)propanoico (2,2 mg, 0,010 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados HATU (3,7 mg, 0,0098 mmol) e DIEA (3,6 mg, 0,028 mmol). A reação foi agitada por 5 min e, então, ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (8 mg, 0,0093 mmol) em DMF (0,5 ml) foi adicionado. A mistura de reação foi agitada à TA por 1 h e, então, concentrada e purificada por HPLC preparatória (10 a 60% de acetonitrila-H₂O contendo 0,05% de TFA) para obter ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(2-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)etóxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**C1**). MS *m/z* 937,5 (M+H). Tempo de retenção 1,138 min.

Exemplo 2: Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-

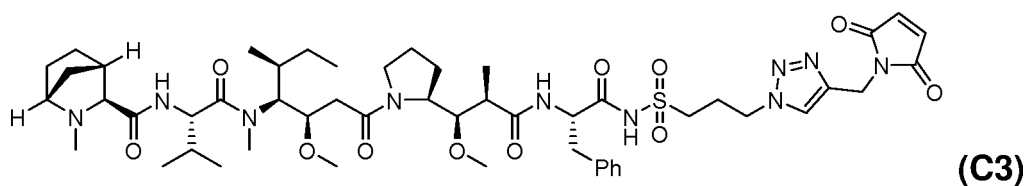
((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**C2**)



[00546] Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) foi produzido de acordo com o método no Exemplo 1, exceto na etapa 6

[00547] Ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoico (EMCA)(1,2 mg, 0,0058 mmol) em DMF (1,0 ml) foi usado no lugar de ácido 3-(2-(maleimido)etóxi)propanoico. Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metóxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metóxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) MS m/z 935,6 ($M+1$). Tempo de retenção 1,17 minuto.

Exemplo 3: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**C3**)



[00548] **Etapa 1:** A uma solução agitada de azida de sódio (3,50 g, 53,8 mmol) em água (25 ml) foi adicionada uma solução de 1,3-propano sulfona (6,10 g, 50,0 mmol) em acetona (25 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas e concentrada até secar. O sólido resultante foi suspenso em éter dietílico (100 ml) e agitado em refluxo por 1 hora. A suspensão foi resfriada à temperatura ambiente e o sólido foi coletado por filtração, lavado com acetona e éter dietílico e seco a vácuo, proporcionando ácido 3-azido-1-propanossulfônico. MS m/z 188,1(M+1). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 3,47 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,87 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,07-2,00 (m, 2H).

[00549] **Etapa 2:** Ácido 3-azido-1-propanossulfônico (2,07 g, 13,0 mmol) foi suspenso em tolueno. PCl_5 (2,61 g, 13,0 mmol) foi adicionado. A mistura foi aquecida em refluxo por 3 horas. A mistura de reação foi resfriada até à temperatura ambiente e filtrada para remover produtos insolúveis. A torta do filtro foi lavada com DCM. Os filtrados combinados foram concentrados para gerar cloreto de 3-azidopropano-1-sulfonila como um óleo amarelo escuro, que foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[00550] **Etapa 3:** A NH_4OH (5 ml) resfriado a 0 °C foi adicionado cloreto de 3-azidopropano-1-sulfonila (1,75 g, 9,53 mmol). Após 10 minutos, a mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada à mesma temperatura por 3 horas. A mistura oleosa tornou-se transparente. A mistura de reação foi extraída com EtOAc três vezes. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre MgSO_4 anidro e concentrada. O solvente residual foi, ainda, removido sob alto vácuo por 18 horas para gerar 3-azidopropano-1-sulfonamida. MS m/z 187,1 (M+1). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4,83 (s, 2H), 3,51 (t, $J = 6,4$ Hz,

2H), 3,23 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,17-2,10 (m, 2H).

[00551] **Etapa 4:** Ácido (S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (100 mg, 0,38 mmol) foi dissolvido em DMF (4 ml), seguido por adição de DIEA (0,395 ml, 2,26 mmol) e HATU (358 mg, 0,940 mmol). Após 15 minutos, 3-azidopropano-1-sulfonamida (186 mg, 1,13 mmol) foi adicionada. A mistura de reação foi agitada por 2 horas, em cujo tempo a análise de LCMS indicou a conclusão da reação. A mistura resultante foi, então, purificada por HPLC de fase reversa com o uso de coluna C18, eluída com 10 a 90% de acetonitrila- H_2O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram agrupadas e liofilizadas para obter (1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato de (S)-terc-butila. MS m/z 312,1 ($M+1$ -Boc). Tempo de retenção 1,15 minuto. O produto assim obtido (72,4 mg, 0,176 mmol) foi dissolvido em HCl metanólico 3 M (5 ml). O solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi absorvido em acetonitrila e H_2O e liofilizado para gerar (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida como um sólido rosa amarelado. MS m/z 312,1 ($M+1$). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,42-7,31 (m, 5H), 4,16-4,13 (m, 1H), 3,51-3,47 (m, 4H), 3,32-3,26 (m, 1H), 3,13-3,08 (m, 1H), 2,00-1,94 (m, 2H).

[00552] **Etapa 5:** A Boc-Val-Dil-Dap-OH (195 mg, 0,34 mmol) dissolvido em DMF (4 ml) foram adicionados DIEA (132 mg, 1,02 mmol) e HATU (108 mg, 0,28 mmol). A mistura de reação foi agitada por 15 minutos à temperatura ambiente antes de (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida (59,2 mg, 0,17 mmol) ter sido adicionada. A mistura de reação foi agitada por 2 horas adicionais à temperatura ambiente. E, então, purificada por HPLC de fase reversa para proporcionar o produto desejado (95 mg, 65% de rendimento, MS m/z 865,4 ($M+1$), Tempo de retenção 1,43 minuto). O produto foi dissolvido em HCl 3 M em MeOH (3 ml). Os solventes foram removidos

sob vácuo. Então, acetonitrila e H₂O foram adicionados ao resíduo e a solução foi liofilizada para obter o produto desejado, (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano. MS *m/z* 765,4 (M+1). Tempo de retenção 1,04 minuto.

[00553] **Etapla 6:** A ácido (1R,3S,4S)-2-(terc-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (16,5 mg, 0,068 mmol) em DMF (2,0 ml) foram adicionados DIEA (17,6 mg, 0,137mmol) e HATU (21,6 mg, 0,057mmol). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 10 minutos antes de (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano (20 mg, sal TFA, 0,023 mmol) ter sido adicionado. A mistura de reação foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente, em cujo tempo a análise de LCMS indicou a conclusão da reação. A mistura resultante foi, então, purificada por HPLC de fase reversa com o uso de coluna C18, eluída com 10 a 90% de ACN-H₂O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram agrupadas e liofilizadas para obter (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(terc-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS *m/z* 988,5 (M+1). Tempo de retenção 1,51 minuto. O produto assim obtido (9,4 mg, 0,0095 mmol) foi dissolvido em HCl metanólico (3 M, 2,0 ml). O solvente foi removido lentamente sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetonitrila e H₂O e liofilizado para gerar (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-

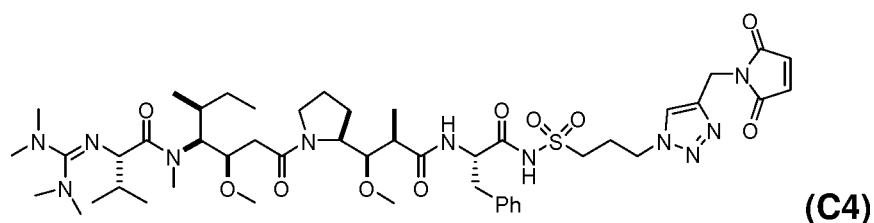
1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida como um sal HCl. MS m/z 888,5 (M+1). Tempo de retenção 1,10 minuto.

[00554] **Etapa 7:** (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (8,8 mg, 0,0099 mmol) foi dissolvida em MeOH (2,0 ml). Paraformaldeído (10,1 mg, 0,337mmol) e ácido acético (0,0102 ml) foram adicionados, seguidos por cianoboro-hidrato de sódio (21,2 mg, 0,337mmol). A mistura de reação foi aquecida a 50 °C com agitação por 1 hora. Paraformaldeído adicional (10,1mg, 0,337mmol), ácido acético (0,0102 ml) e cianoboro-hidrato de sódio (21,2 mg, 0,337mmol) foram adicionados. Após 1 hora a 50 °C, a análise de LCMS indicou a conclusão da reação. A mistura resultante foi, então, purificada por HPLC de fase reversa com o uso de coluna C18, eluída com 10 a 90% de ACN-H₂O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram agrupadas e liofilizadas para obter (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS m/z 902,5 (M+1). Tempo de retenção 1,12 minuto.

[00555] **Etapa 8:** Uma solução de (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (5,2

mg, 0,0058 mmol), 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (1,56 mg, 0,012 mmol) e CuSO₄ (0,7 mg, 0,004 mmol) em DMF (2,0 ml) e H₂O (0,5 ml) foi tratada com sal sódico de ácido L-ascórbico (2,5 mg, 0,014mmol) e agitada à temperatura ambiente por 2 horas. CuSO₄ adicional (0,7 mg, 0,004 mmol) e sal sódico de ácido L-ascórbico (2,5 mg, 0,014 mmol) foram adicionados. Após 2 horas adicionais à temperatura ambiente, a análise de LCMS indicou a conclusão da reação. A mistura resultante foi, então, purificada por HPLC de fase reversa com o uso de coluna C18, eluída com 10 a 90% de acetonitrila-H₂O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram agrupadas e liofilizadas para obter (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**C3**). MS m/z 1037,4 (M+1). Tempo de retenção 1,00 minuto.

Exemplo 4: Síntese de (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano (**C4**)



[00556] **Etapla 1:** A uma solução agitada de azida de sódio (3,5 g, 54 mmol) em água (25 ml) foi adicionada uma solução de 1,3-propano sulfona (6,1 g, 50 mmol) em acetona (25 ml). A mistura de reação foi

agitada à TA durante 24 h e concentrada. O sólido resultante foi suspenso em éter dietílico (100 ml) e agitado em refluxo por 1 hora. A suspensão foi resfriada à TA. O sólido foi coletado por filtração, lavado com acetona e éter dietílico e seco a vácuo, proporcionando ácido 3-azido-1-propanossulfônico. MS m/z 188,1 ($M+23$). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 3,47 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,87 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,07-2,00 (m, 2H).

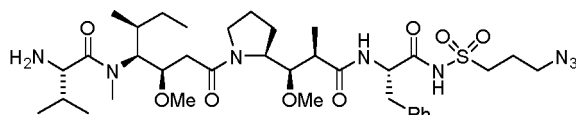
[00557] **Etapla 2:** Ácido 3-azido-1-propanossulfônico (2,07 g, 13 mmol) foi suspenso em tolueno. PCl_5 (2,61 g, 13 mmol) foi adicionado. A mistura foi aquecida a refluxo por 3 h. A reação foi resfriada à TA. As matérias insolúveis foram removidas por filtração e lavadas com DCM. O filtrado combinado foi concentrado para gerar cloreto de 3-azidopropano-1-sulfonila como um óleo marrom amarelado, que foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[00558] **Etapla 3:** NH_4OH (28%, 5 ml) foi resfriado a 0 °C. Cloreto de 3-azidopropano-1-sulfonila (1,75 g, 9,53 mmol) foi adicionado. Após 10 min, a reação foi aquecida à TA e, então, foi agitada por 3 horas à TA. As duas fases tornaram-se homogêneas. A mistura de reação foi extraída com EtOAc três vezes. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas sobre MgSO_4 e concentradas em um evaporador giratório seguido por alto vácuo por 18 h para gerar 3-azidopropano-1-sulfonamida. MS m/z 187,1 ($M+23$). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4,83 (s, 2H), 3,51 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,23 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,17-2,10 (m, 2H).

[00559] **Etapla 4:** Ácido (S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (100 mg, 0,38 mmol) foi dissolvido em DMF (4 ml). DI-EA (0,395 ml, 2,26 mmol) e HATU (358 mg, 0,94 mmol) foram adicionados. Após 15 min, 3-azidopropano-1-sulfonamida (186 mg, 1,13 mmol) foi adicionada. A reação foi agitada por 2 h. LCMS indicou uma conclusão da reação. A mistura de reação foi purificada por HPLC

preparatória com o uso de um gradiente de 10 a 90% para obter (1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato de (S)-terc-butila. MS m/z 312,1 ($M+1$ -Boc). Tempo de retenção 1,15 min. O produto, assim, obtido (72,4 mg, 0,176 mmol) foi dissolvido em HCl metanólico (3 M, 5 ml). O solvente foi removido por evaporação. O resíduo foi liofilizado a partir de acetonitrila e H₂O para gerar (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida como um sólido rosa amarelado. MS m/z 312,1 ($M+1$) ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,42-7,31 (m, 5H), 4,16-4,13 (m, 1H), 3,51-3,47 (m, 4H), 3,32-3,26 (m, 1H), 3,13-3,08 (m, 1H), 2,00-1,94 (m, 2H).

[00560] **Etapa 5:** A Boc-Val-Dil-Dap-OH (195 mg, 0,34 mmol) em DMF (4 ml) foram adicionados DIEA (132 mg, 1,02 mmol) e HATU (108 mg, 0,28 mmol). O mesmo foi agitado 15 min à TA. (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida (59,2 mg, 0,17 mmol) foi adicionada. A reação foi agitada durante 2 h à TA. O material bruto foi purificado por HPLC preparatória para proporcionar o produto desejado (95 mg, 65% de rendimento, MS m/z 865,4 ($M+1$), Tempo de retenção 1,43 minuto). O produto foi dissolvido em HCl 3 M em MeOH (3 ml). Os solventes foram removidos por evaporação. O resíduo foi liofilizado a partir de acetonitrila-água para obter (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano,



, como um sal HCl, MS m/z 765,4

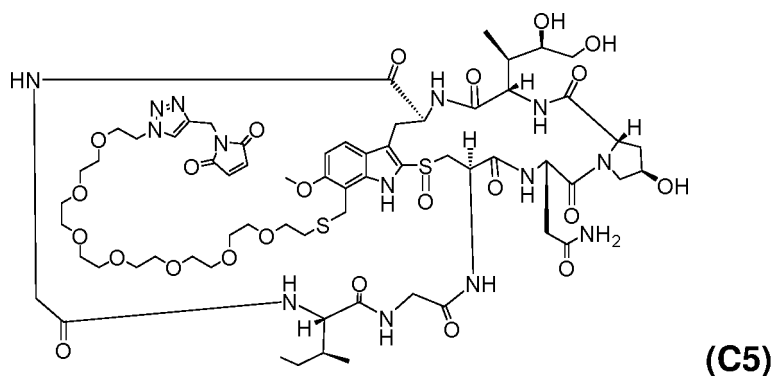
($M+1$), tempo de retenção 1,04 min.

[00561] **Etapa 6:** A sal HCl de (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano (20 mg, 0,025

mmol) em DMF (2 ml) foram adicionados DIEA (0,024 ml, 0,14 mmol) e HATU (21,6 mg, 0,057 mmol). A reação foi agitada à TA por 2 h. LCMS indicou uma conclusão da reação. A mistura resultante foi, então, purificada por HPLC preparatória com o uso de um gradiente de 10 a 90% para obter (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano como um sal TFA. MS m/z 863,5 (M+1). Tempo de retenção 1,169 min.

[00562] **Etap** 7: Sal TFA de (S)-2-((Bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano (87,4 mg, 0,089 mmol) e 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (24,2 mg, 0,0179 mmol) foram suspensos em 3,0 ml cada de t-BuOH e água. O recipiente de reação foi preenchido com N₂ por ciclo de vácuo-preenchimento com N₂ cinco vezes. As soluções desgaseificadas de L-ascorbato de sódio (17,7 mg, 0,089 mmol) em H₂O (2,4 ml) e CuSO₄ (2,86 mg, 0,018 mmol) em H₂O (0,6 ml) foram adicionadas sucessivamente, e a reação foi agitada à TA por 5 h. LCMS indicou a conclusão da reação. O material bruto foi purificado por HPLC preparatória com o uso de um gradiente de 20 a 45% para obter (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metóxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metóxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano (**C4**) como um sal TFA. MS m/z 998,5 (M+1). Tempo de retenção 1,014 min.

Exemplo 5: Síntese de 6'O-metil-7'C-((23-(4-((2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina **(C5)**, 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina **(A-3)** e 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina **(A4)**



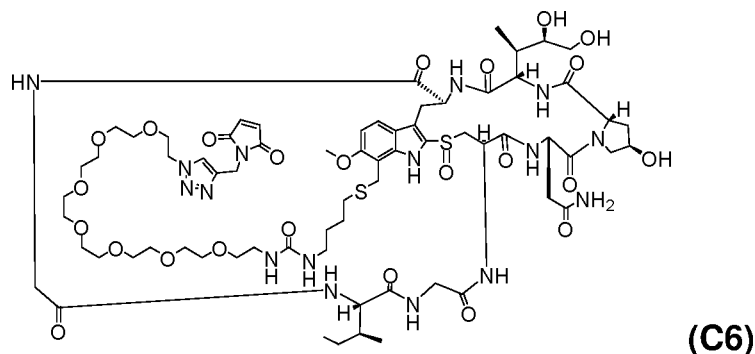
[00563] **Etapa 1:** Formaldeído (0,035 ml, 0,44 mmol) e 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano-1-tiol (35 mg, 0,11 mmol) foram adicionados a uma solução de α -Amanitina (20 mg, 0,022 mmol) em MeOH (2 ml). Trietilamina (1,2 ml, 8,7 mmol) e ácido acético (0,25 ml, 4,4 mmol) foram adicionados à mistura de reação e purgados com gás N₂ três vezes. A mistura de reação foi agitada a 40 °C por 2 dias. Após concentração a vácuo, o resíduo foi, então, purificado por HPLC e liofilizado para gerar 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina. MS (m+1) = 1342,4, HPLC Pico TR = 0,834 min, ¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 10,65 (s, 1H), 8,81 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,45 (m, 2H), 8,33 (s, 1H), 8,14 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 8,00 (d, 1H, J = 12,0 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 11,0 Hz), 7,67 (s, 1H), 7,48 (d, 1H, J = 11,0 Hz), 6,69 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 5,25 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 4,74 (s l, 1H), 4,61 (dd, 1H, J = 6,5 e 12,0 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,29 (dd, 1H, J = 10,5 e 23,0 Hz), 4,09 (m, 3H), 3,92 (m, 1H), 3,38~3,73 (m, 43H), 3,29 (m, 2H), 3,21 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,56 (m, 2H), 2,39 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,60 (m, 2H), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 9,0 Hz), 0,85 (m, 6H).

[00564] **Etapla 2:** 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina (14,0 mg, 0,011 mmol) e DMSO (1 ml) foram tratados com metiliodo (0,0007 ml) e K₂CO₃ (1,5 mg) à TA e agitados à TA por 1 h. Metiliodo adicional (0,0007 ml) e K₂CO₃ (1,5 mg) foram adicionados à TA por 2 h. Metiliodo (0,0007 ml) e K₂CO₃ (1,5 mg) à TA e agitados à TA por 2 h, novamente. A mistura de reação foi então purificada por RP-C18 ISCO e liofilizada para gerar 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina. MS (m+2/2) = 679,0, HPLC Pico TR = 0,887 min, 1H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 10,75 (s, 1H), 8,83 (m, 1H), 8,64 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,52 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 8,47 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 8,36 (s, 1H), 8,18 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 9,5 Hz), 7,96 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,69 (s, 1H), 6,98 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 5,33 (m, 1H), 5,18 (m, 1H), 4,80 (s l, 1H), 4,68 (dd, 1H, J = 5,5 e 9,5 Hz), 4,56 (m, 2H), 4,35 (dd, 1H, J = 9,0 e 18,5 Hz), 4,10~4,21 (m, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,45~3,79 (m, 42H), 3,35~3,44 (m, 3H), 3,11 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,61 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 2,06 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,21 (m, 1H), 0,99 (d, 3H, J = 7,0 Hz), 0,90 (m, 6H).

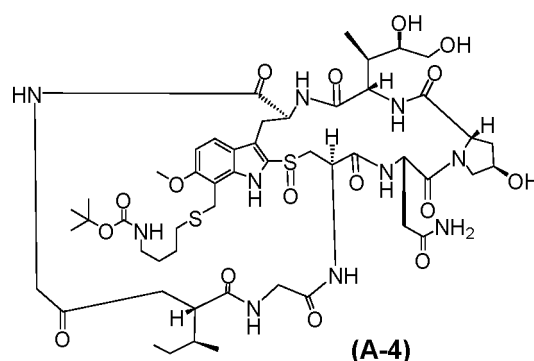
[00565] **Etapla 3:** 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina (8 mg, 0,006 mmol) e 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (2 mg, 0,012 mmol) foram adicionados a t-butanol (0,5 ml), e a mistura de reação foi purgada com gás N₂ cinco vezes. Sal sódico de ácido L-ascórbico (1 mg, 0,006 mmol), CuSO₄ (0,2 mg, 0,0012 mmol) e 0,5 ml de H₂O foram então adicionados. A mistura de reação foi purgada com gás N₂ cinco vezes e agitada à TA por 4 h e, então, purificada por RP-C18 ISCO para gerar 6'O-metil-7'C-((23-(4-((2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)- α -Amanitina (**C5**). MS (m+2/2) = 746,5, HPLC Pico TR = 0,850 min, 1H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 10,74 (s, 1H), 8,83 (m, 1H), 8,63 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,51 (d,

1H, J = 10,0 Hz), 8,47 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 8,36 (s, 1H), 8,17 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,04 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 7,96 (d, 1H, J = 9,5 Hz), 7,94 (s, 1H), 7,69 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,97 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,83 (s, 2H), 5,34 (m, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,79 (s, 1H), 4,75 (s, 2H), 4,68 (dd, 1H, J = 5,0 e 9,5 Hz), 4,56 (m, 2H), 4,52 (t, 1H, J = 5,0 Hz), 4,34 (dd, 1H, J = 9,0 e 18,5 Hz), 4,08~4,20 (m, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,39~3,78 (m, 38H), 3,10 (m, 1H), 2,94 (dd, 1H, J = 14,0 e 15,0 Hz), 2,61 (m, 2H), 2,41 (m, 2H), 2,05 (m, 1H), 1,57~1,68 (m, 2H), 1,20 (m, 1H), 0,99 (d, 3H, J = 7,0 Hz), 0,91 (m, 6H).

Exemplo 6: Síntese de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(23-((4-maleimido)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosil)ureido)butiltio)metil)- α -Amanitina (**C6**)

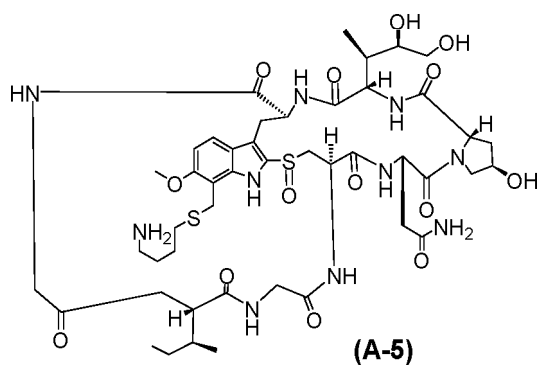


[00566] **Etapla 1:** Formaldeído (0,027 ml, 0,33 mmol) e (4-mercaptobutil)carbamato de terc-butila (**i-7**) (34 mg, 0,16 mmol) foram adicionados a uma solução de α -Amanitina (**A**) (15 mg, 0,016 mmol) em MeOH (5 ml) e trietilamina (0,46 ml, 3,26 mmol) em um frasco de 40 ml, e a mistura de reação foi agitada a 40 °C por 3 dias. Após concentração a vácuo, o resíduo foi dissolvido em 2 ml de MeOH e 408 μ l de 2 M de trimetilsilil diazometano em éter dietílico foram adicionados, e a mistura foi agitada por 2 h à TA. Então, mais 408 μ l de 2 M de trimetilsilil diazometano em éter dietílico foram adicionados e agitados à TA por 2 h. A mistura de reação foi purificada por HPLC e liofilizada para gerar 6'O-metil-7'C-((4-t-butoxicarbonilaminobutiltio)metil)- α -Amanitina (**A-4**),



[00567] MS ($m+2\text{-}boc/2$) = 525,8, HPLC Pico TR = 0,936 min, ^1H -RMN (MeOD- d_4 , 400 MHz) δ 10,78 (s, 1H), 8,84 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 8,48 (s, 1H), 8,46 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 8,35 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,01 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 7,92 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,69 (s, 1H), 7,63 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,92 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 5,28 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,73 (s, 1H), 4,61 (dd, 1H, $J = 5,6$ e 8,4 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,30 (dd, 1H, $J = 8,8$ e 18,4 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, $J = 13,2$ Hz), 3,94 (d, 1H, $J = 13,2$ Hz), 3,92 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,35~3,75 (m, 14H), 3,05 (m, 1H), 2,92 (m, 3H), 2,49 (m, 4H), 2,00 (m, 1H), 1,39~1,65 (m, 8H), 1,37 (s, 9H), 1,15 (m, 1H), 0,93 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 0,84 (m, 6H).

[00568] **Etapla 2:** TFA (1 ml) foi adicionado a 8 mg de composto **(A-4)** em um frasco de 40 ml, e a solução resultante foi deixada em repouso à TA por 2 min e, então, concentrada a vácuo para gerar 6'O-metil-7'C-((4-aminobutiltio)metil)- α -Amanitina **(A-5)**,

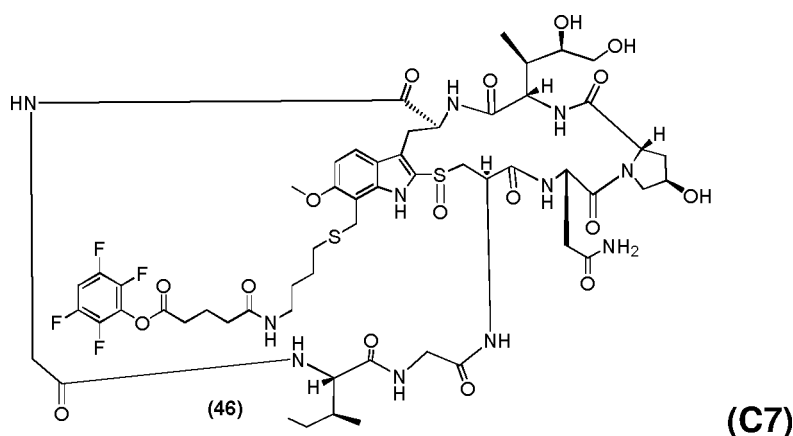


, que foi usada sem purificação adicional. MS ($m+1$) = 1050,4, HPLC Pico TR = 0,635 min, ^1H -RMN (MeOD- d_4 , 400 MHz) δ 8,87 (m, 1H), 8,58 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 8,48 (d,

1H, J = 10,4 Hz), 8,44 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 8,16 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,97 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 7,62 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 5,25 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,73 (m, 1H), 4,60 (dd, 1H, J = 5,6 e 9,2 Hz), 4,49 (m, 2H), 4,28 (dd, 1H, J = 8,8 e 18,4 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,99 (s, 2H), 3,92 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,83 (s, 1H), 3,60~3,72 (m, 4H), 3,30~3,60 (m, 10H), 3,00~3,20 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,50~1,75 (m, 7H), 1,16 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 1,24 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,85 (m, 6H).

[00569] **Etapla 3:** Trietilamina (3 µl, 18 µmol) foi adicionada a uma solução de composto **(A-5)** (7,5 mg, 7 µmol) e (23-(4-((2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosil)carbamato de 4-nitrofenila (5,0 mg, 7 µmol) em DMF (1 ml) e a mistura de reação foi agitada à TA por 2 h, purificada por HPLC e liofilizada para gerar 6'O-metil-7'C-((4-(3-(23-((4-maleimido)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosil)ureido)butiltio)metil)-α-Amanitina **(C6)**. MS (m+2/2) = 803,5, HPLC Pico TR = 0,834 min, 1H-RMN (MeOD-d4, 400 MHz) δ 10,76 (s, 1H), 8,84 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,49 (s, 1H), 8,47 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,15 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,90 (s, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 6,79 (s, 2H), 5,28 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,62 (dd, 1H, J = 5,2 e 9,6 Hz), 4,49 (m, 4H), 4,30 (dd, 1H, J = 8,8 e 18,4 Hz), 4,14 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,94 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,92 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,80 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 3,35~3,75 (m, 38H), 2,90~3,10 (m, 4H), 2,92 (m, 1H), 2,40 (m, 4H), 2,01 (m, 1H), 1,38~1,65 (m, 6H), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,85 (m, 6H).

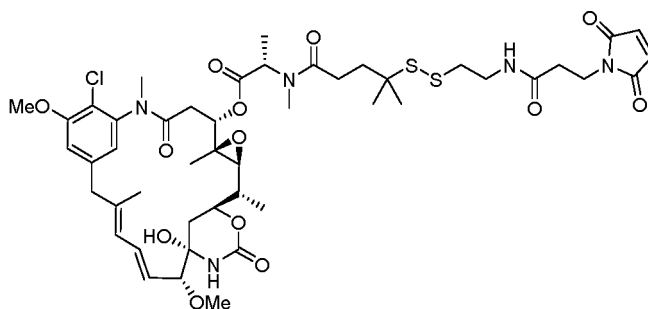
Exemplo 7: Síntese de éster tetrafluorofenílico de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(carbóxi)propanocarboxamido)butiltio)metil)-α-Amanitina **(C7)**



[00570] **(A-5)** (5 mg, 5 μ mol) e DMF (1 ml) foram combinados em um frasco de 40 ml para gerar uma solução transparente. bis(2,3,5,6-tetrafluorofenil) glutarato (2 mg, 5 μ mol) e DIEA (4 μ l, 20 μ mol) foram adicionados. Após a mistura de reação ter sido agitada à TA por 2 h, a mistura de reação foi purificada por HPLC para gerar éster tetrafluorofenílico de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(carbóxi)propanocarboxamido)-butiltio)metil)- α -Amanitina **(C-7)**. MS ($m+1$) = 1313,3, HPLC Pico TR = 0,996 min, ^1H -RMN (MeOD, 400 MHz) δ 10,78 (s, 1H), 8,85 (m, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,47 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 8,35 (s l, 1H), 8,15 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,69 (s l, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,36 (m, 1H), 6,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 5,27 (m, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,75 (s l, 1H), 4,61 (dd, 1H, J = 5,2 e 9,6 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,30 (dd, 1H, J = 8,4 e 18,0 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,00 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,95 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,91 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,34~3,70 (m, 9H), 3,08 (m, 4H), 2,91 (m, 1H), 2,73 (t, 2H, J = 14,4 Hz), 1,98 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 1,92~2,04 (m, 1H), 1,40~1,60 (m, 6H), 1,16 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,87 (m, 6H)..

[00571] Outros compostos de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (A-1), Fórmula (A-2), Fórmula (A-3), Fórmula (B-1), Fórmula (A-1a), Fórmula (A-2a), Fórmula (A-3a) ou Fórmula (B-1a) podem ser produzidos com o uso dos métodos dos Exemplos 1 a 7 e materiais de partida adequados.

Exemplo 8: Preparação da carga útil de ligante MPET.DM4:



Métodos Analíticos

[00572] A não ser que indicado de outro modo, os seguintes métodos de HPLC e HPLC/MS foram usados na preparação de Intermediários e Exemplos.

[00573] A análise de LC/MS foi realizada em um sistema Agilent 1200sl/6140.

[00574] Coluna: Waters Acquity HSS T3 C18, 50x2,0, 1,8 um

Fase Móvel: A) H₂O + 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

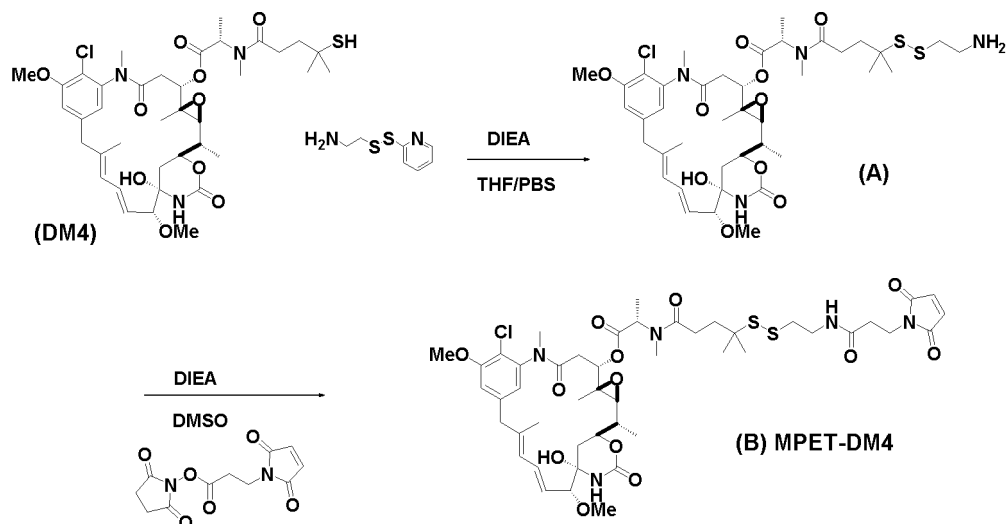
Varredura de MS: 200 a 1.350 amu

ELSD: 60 °C

Parâmetros de MS:

Polaridade	Positiva
Gás de secagem	12
Pressão de nebulizador	50
Temperatura de gás de secagem	350
Tensão capilar	3000

[00575] 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)-benzenaciclodecatetra-10,12-dien-4-ila



[00576] Etapa 1: Preparação de N-(4-((2-aminoetil)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)-benzenaciclodecatetra-10,12-dien-4-ila

[00577] 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 min e concentrada a vácuo. O resíduo aquoso foi diluído com CH₃CN (1 ml) e H₂O (2 ml) e purificado por ISCO de fase reversa, eluído com 10 a 60% de acetonitrila-H₂O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram liofilizadas para obter o produto desejado (555 mg, 93% de rendimento). ¹H 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) 1,45-1,55 (m, 3 H)

1,67 (s, 3 H) 1,84-1,88 (m, 1 H) 1,95 - 2,01 (m, 1 H) 2,14 (dd, $J=5,0$ 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) 3,35 (s, 3 H) 3,55 (d, $J=5,0$ Hz, 1 H) 3,58 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 4,15-4,20 (m, 1 H) 4,64 (dd, $J=5,0$ e $10,0$ Hz, 1 H) 5,43 (q, $J=5,0$ Hz, 2 H) 5,66 (dd, $J=10,0$ e $15,0$ Hz, 1 H)) 6,58 (dd, $J=10,0$ e $15,0$ Hz, 1 H) 6,65 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 7,11 (s l, 1H) 7,28 (s l, 1H); MS m/z 855,3 ($M+H$), Tempo de retenção 0,988 minuto.

[00578] 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)-benzenacicotetradecafano-10,12-dien-4-ila.

[00579] A N-(4-((2-aminoetil)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)-benzenacicotetradecafano-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 com o uso de TFA. A mistura foi resfriada a 0 °C com banho gelado, seguido por adição de CH_3CN (2 ml) e H_2O (7 ml) e, então, purificada por ISCO de fase reversa, eluindo com 10 a 70% de acetonitrila- H_2O contendo 0,05% de TFA. As frações contendo o produto desejado foram liofilizadas para obter o produto desejado (430 mg, 66% de rendimento). ^1H 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

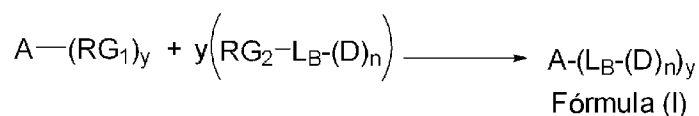
H) 1,28 (d, $J=5,0$ Hz, 3 H) 1,31 (d, $J=5,0$ Hz, 3 H) 1,43-1,49 (m, 1 H) 1,61 (d, $J=15,0$ Hz, 1 H) 1,64 (s, 3 H) 1,81-1,87 (m, 1 H) 1,94 - 2,01 (m, 1 H) 2,19 (dd, $J=5,0$ e 15,0 Hz, 1 H) 2,30-2,36 (m, 1 H) 2,54 (t, $J=5,0$ Hz, 2 H) 2,61 (dd, $J=10,0$ e 15,0 Hz, 1 H) 2,70 (t, $J=5,0$ Hz, 2 H) 2,88 (s, 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.

3. Conjugação e Preparação de ADCs

Processos para Produzir Conjugado de Anticorpo de Fórmula (I)

[00580] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (I) é mostrado no Esquema 1 abaixo:

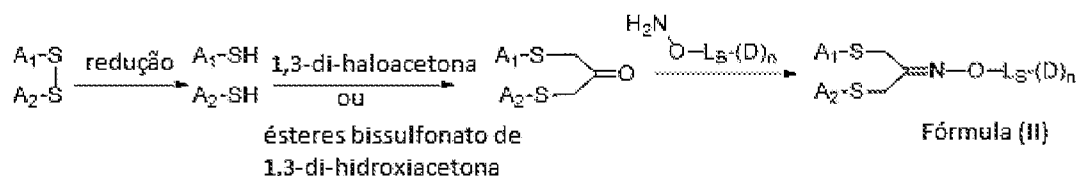
Esquema 1



em que: RG_1 é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo reativo compatível, RG_2 , fixado à porção química de ligante-fármaco, ligando, assim, covalentemente o fragmento de anticorpo, A, a uma ou mais porções químicas de ligante-fármaco. Um exemplo não limitante de tais reações de grupos RG_1 e RG_2 é uma maleimida (RG_2) que reage com um tiol (RG_1) para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina (RG_2) que reage com uma cetona (RG_1) para gerar uma oxima.

[00581] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (II) é mostrado no Esquema 2 abaixo:

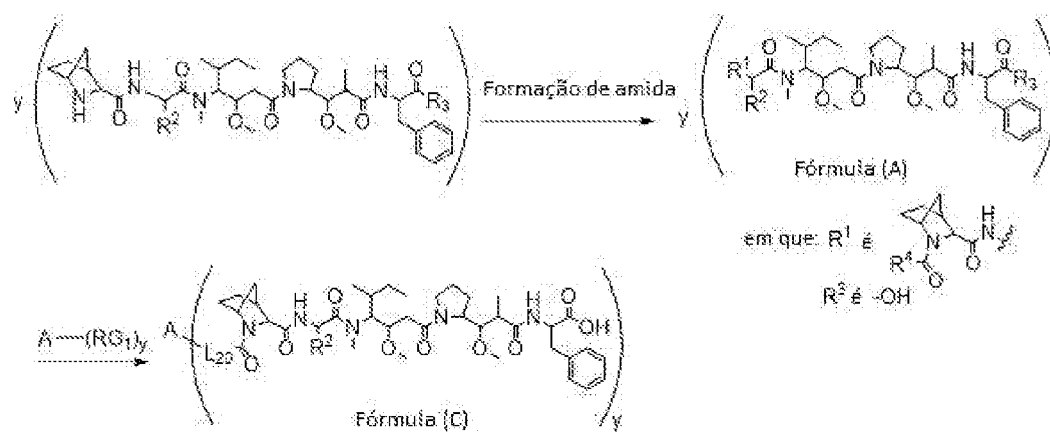
Esquema 2



em que: A₁, A₂, L_B, D e n são conforme definidos no presente documento, a 1,3-di-haloacetona é selecionada dentre 1,3-dicloroacetona, 1,3-dibromoacetona e 1,3-di-iodoacetona, e a etapa de redução é realizada com o uso de um agente de redução selecionado dentre ditioneitol (DTT) e cloridrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl).

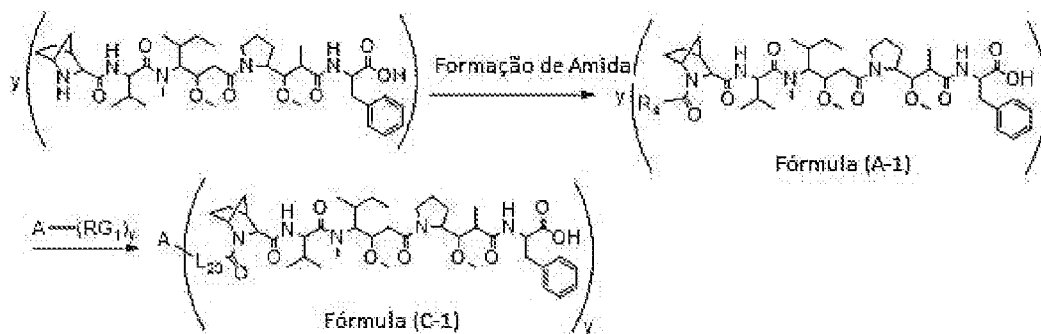
[00582] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (C) é mostrado no Esquema 3 abaixo:

Esquema 3



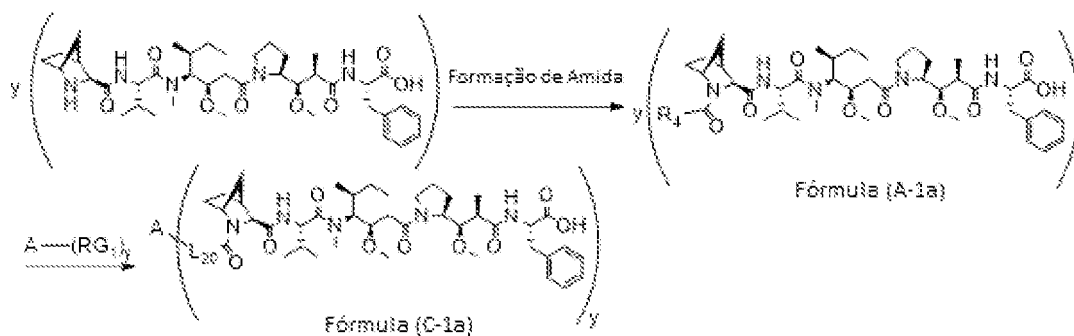
em que: L₂₀ é -L₁R⁴⁰; R⁴ é -L₁R¹⁴, -L₂R²⁴ ou -L₂R³⁴ e RG₁ é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R¹⁴, R²⁴ ou R³⁴ compatível de um composto de Fórmula (A) para formar um grupo R⁴⁰ correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, R², L₁, L₂, R¹⁴, R²⁴, R³⁴ e R⁴⁰ são conforme definidos no presente documento.

[00583] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (C-1) é mostrado no Esquema 4 abaixo:

Esquema 4

em que: L_{20} é $-L_1R^{40}$; R^4 é $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$ ou $-L_2R^{34}$ e RG_1 é um grupo reativo que reage com um grupo R^{14} , R^{24} ou R^{34} compatível de um composto de Fórmula (A-1) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, L_1 , L_2 , R^{14} , R^{24} , R^{34} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

[00584] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (C-1a) é mostrado no Esquema 5 abaixo:

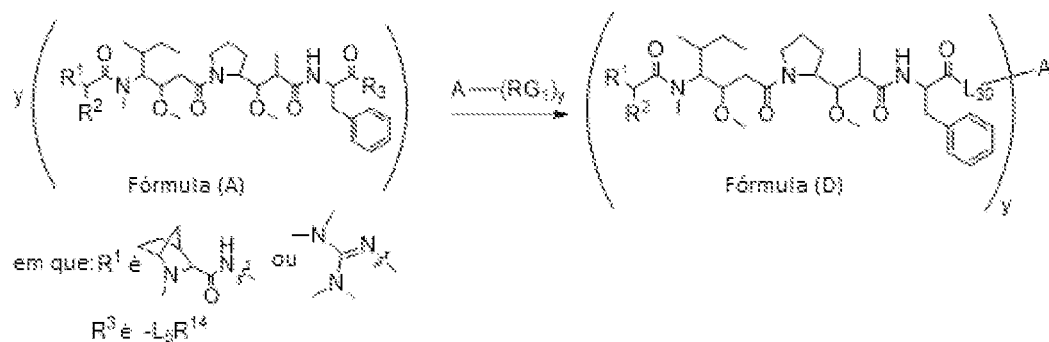
Esquema 5

em que: L_{20} é $-L_1R^{40}$; R^4 é $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$ ou $-L_2R^{34}$ e RG_1 é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R^{14} , R^{24} ou R^{34} compatível de um composto de Fórmula (A-1a) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, L_1 , L_2 , R^{14} , R^{24} , R^{34} e R^{40} são conforme definidos

no presente documento.

[00585] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (D) é mostrado no Esquema 6 abaixo:

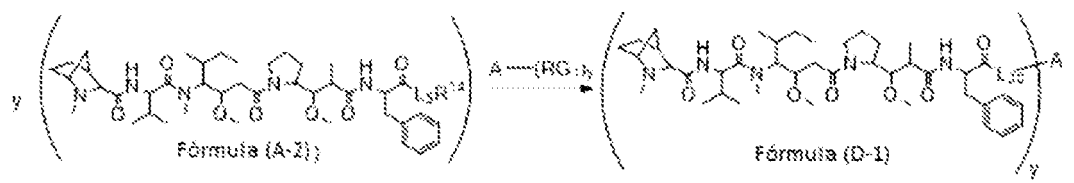
Esquema 6



em que: L_{30} é $-L_5R^{40}$; R^3 é $-L_5R^{14}$ e RG_1 é um grupo reativo que, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, reage com um grupo R^{14} compatível de um composto de Fórmula (A) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, R^2 , L_5 , R^{14} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

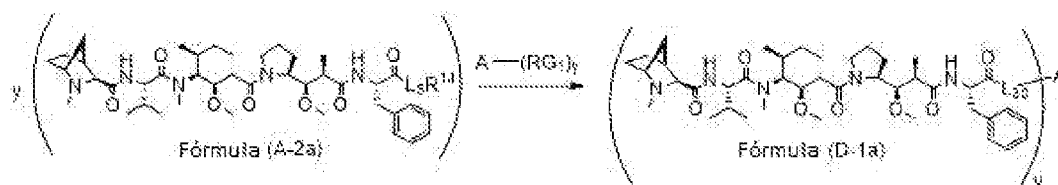
[00586] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (D-1) é mostrado no Esquema 7 abaixo:

Esquema 7



[00587] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (D-1a) é mostrado no Esquema 8 abaixo:

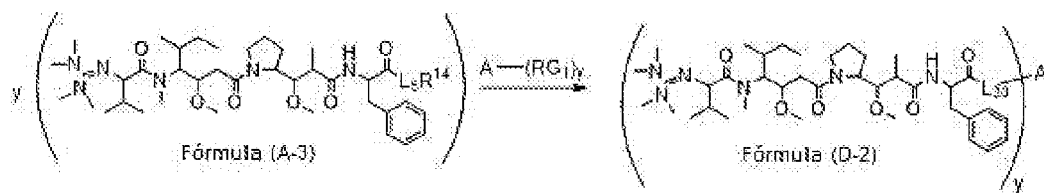
Esquema 8



em que: L₃₀ é -L₅R⁴⁰ e RG₁ é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R¹⁴ compatível de um composto de Fórmula (A-2) para formar um grupo R⁴⁰ correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, L₅, R¹⁴ e R⁴⁰ são conforme definidos no presente documento.

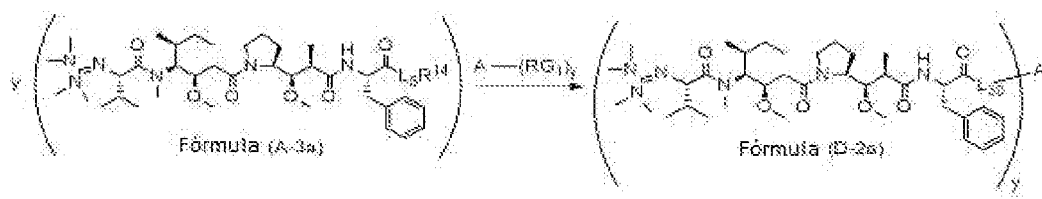
[00588] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (D-2) é mostrado no Esquema 9 abaixo:

Esquema 9



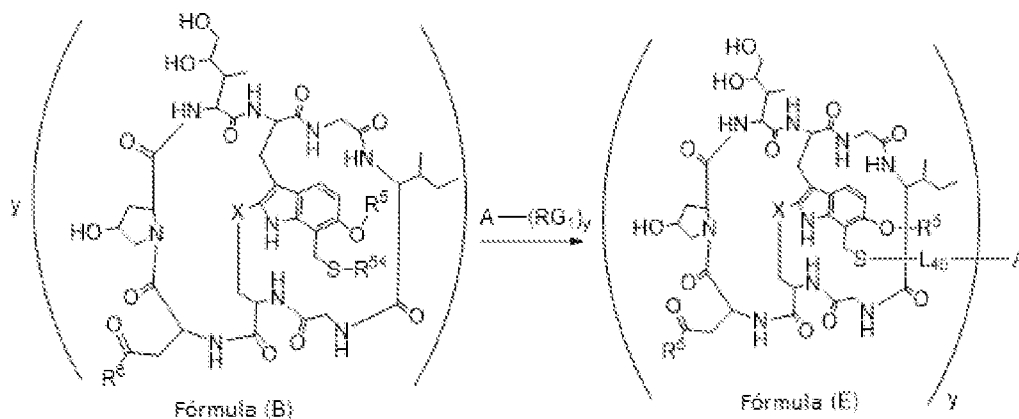
em que: L₃₀ é -L₅R⁴⁰ e RG₁ é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R¹⁴ compatível de um composto de Fórmula (A-3) para formar um grupo R⁴⁰ correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, L₅, R¹⁴ e R⁴⁰ são conforme definidos no presente documento.

[00589] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (D-2a) é mostrado no Esquema 10 abaixo:

Esquema 10

em que: L_{30} é $-L_5R^{40}$ e RG_1 é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R^{14} compatível de um composto de Fórmula (A-3a) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, L_5 , R^{14} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

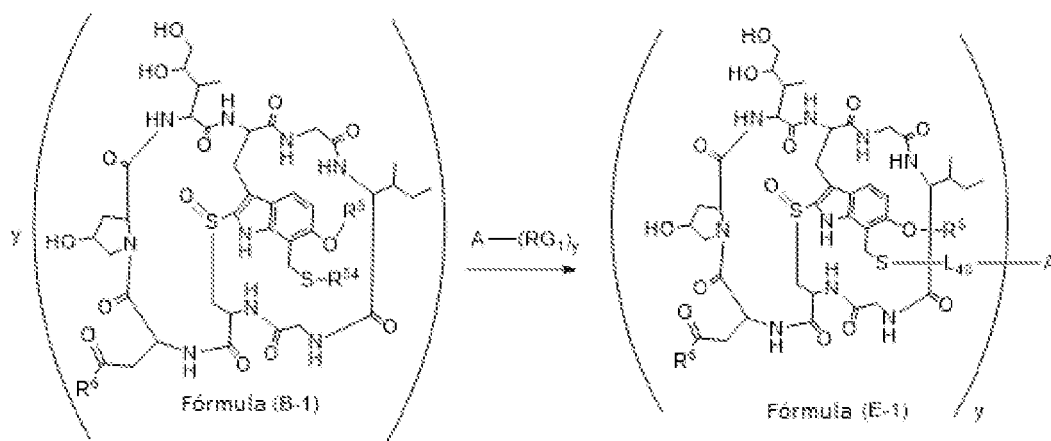
[00590] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (E) é mostrado no Esquema 11 abaixo:

Esquema 11

em que: L_{40} é $-L_6R^{40}$; R^{54} é $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$ ou $-L_7R^{34}$ e RG_1 é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R^{14} , R^{24} ou R^{34} compatível de um composto de Fórmula (B) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, X, R^5 , R^6 , L_6 , L_7 , R^{14} , R^{24} , R^{34} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

[00591] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (E-1) é mostrado no Esquema 12 abaixo:

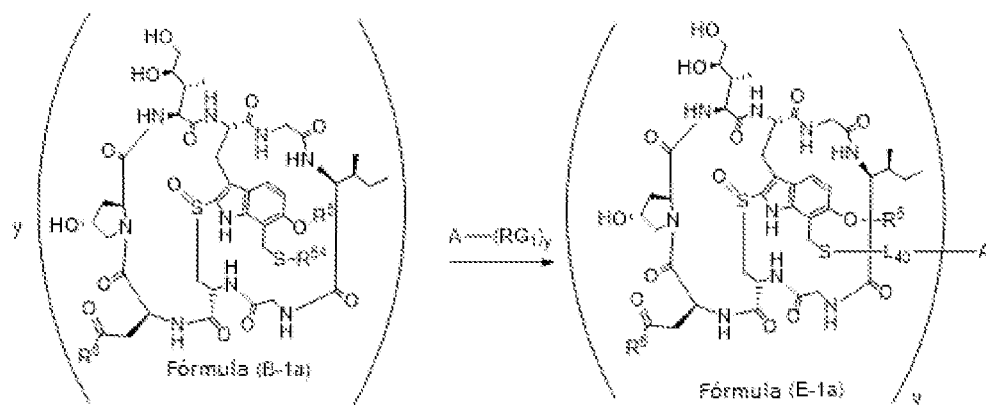
Esquema 12



em que: L_{40} é $-L_6R^{40}$; R^{54} é $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$ ou $-L_7R^{34}$ e RG_1 é um grupo reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R^{14} , R^{24} ou R^{34} compatível de um composto de Fórmula (B-1) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A , y , R^5 , R^6 , L_6 , L_7 , R^{14} , R^{24} , R^{34} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

[00592] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados de Fórmula (E-1a) é mostrado no Esquema 13 abaixo:

Esquema 13

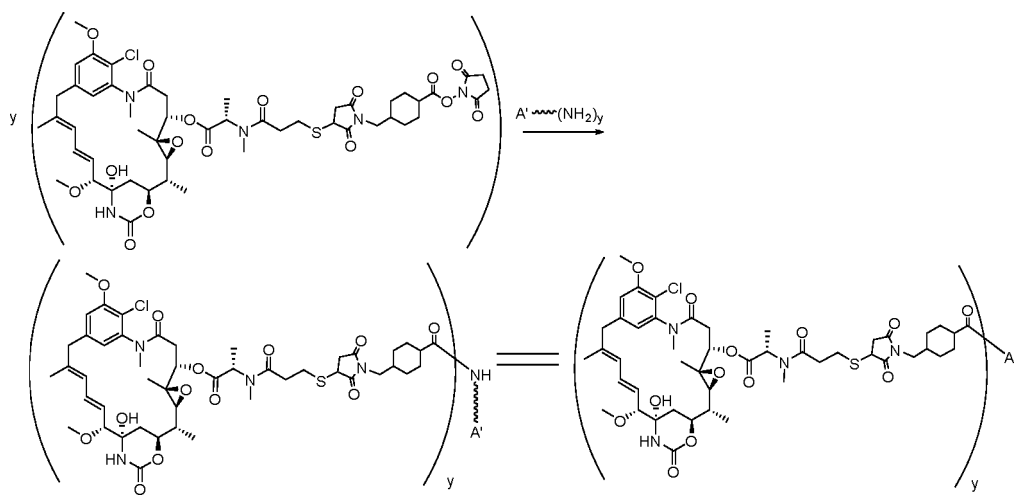


em que: L_{40} é $-L_6R^{40}$; R^{54} é $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$ ou $-L_7R^{34}$ e RG_1 é um grupo

reativo, a título de exemplo apenas, um tiol ou amina ou cetona, que reage com um grupo R^{14} , R^{24} ou R^{34} compatível de um composto de Fórmula (B-1a) para formar um grupo R^{40} correspondente. A título de exemplo, uma maleimida que reage com um tiol para gerar um anel succinimida, ou uma hidroxilamina que reage com uma cetona para gerar uma oxima. A, y, R^5 , R^6 , L_6 , L_7 , R^{14} , R^{24} , R^{34} e R^{40} são conforme definidos no presente documento.

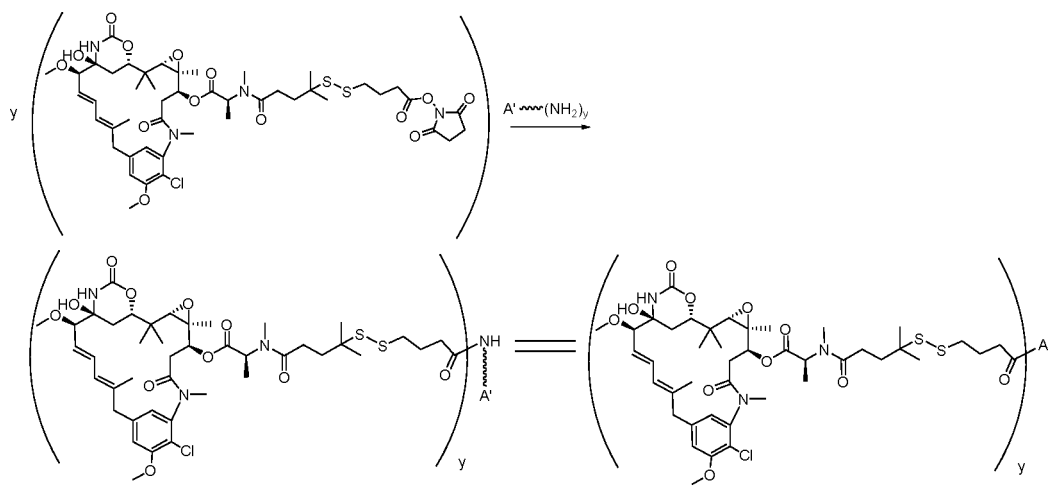
[00593] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados que compreendem uma porção química maitansinoide é mostrado no Esquema 14 abaixo:

Esquema 14



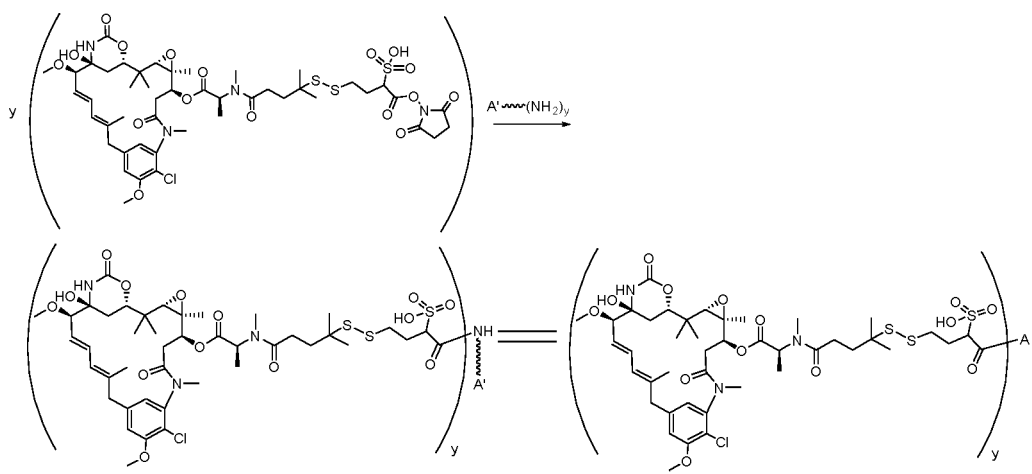
em que um ou mais ésteres NHS de uma ou mais cargas úteis de ligante reage com uma ou mais aminas livres em A (isto é $A'-(NH_2)_y$), formando, assim, um conjugado. A é conforme definido no presente documento, e A' é a porção de A que não inclui a porção química amina livre.

[00594] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados que compreendem uma porção química maitansinoide é mostrado no Esquema 15 abaixo:

Esquema 15

em que um ou mais ésteres NHS de uma ou mais cargas úteis de ligante reage com uma ou mais aminas livres em A (isto é $A'-(NH_2)_y$), formando, assim, um conjugado. A é conforme definido no presente documento, e A' é a porção de A que não inclui a porção química amina livre.

[00595] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados que compreendem uma porção química maitansinoide é mostrado no Esquema 16 abaixo:

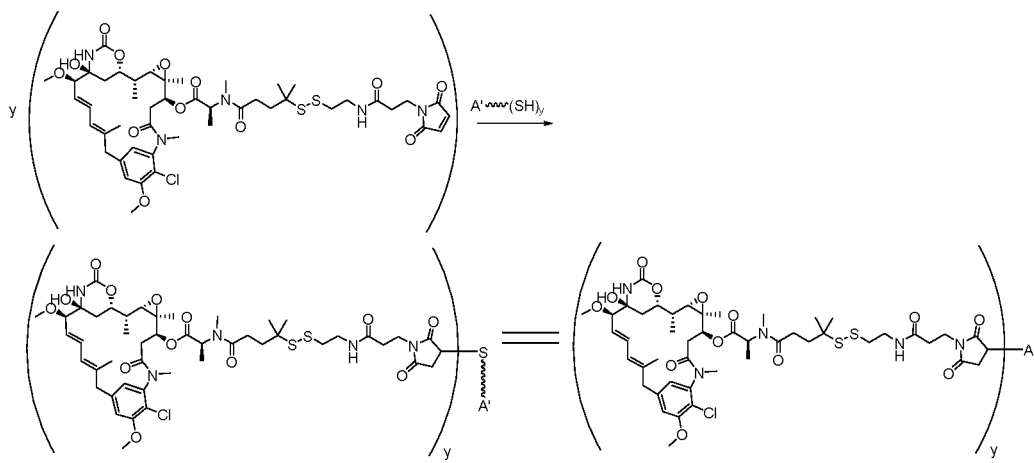
Esquema 16

em que um ou mais ésteres NHS de uma ou mais cargas úteis de ligante reage com uma ou mais aminas livres em A (isto é $A'-(NH_2)_y$), formando, assim, um conjugado. A é conforme definido no presente documento, e A' é a porção de A que não inclui a porção química ami-

na livre.

[00596] Um esquema de reação geral para a formação de conjugados que compreendem uma porção química maitansinoide é mostrado no Esquema 17 abaixo:

Esquema 17



em que uma ou mais maleimidaz de uma ou mais cargas úteis de ligante reage com um ou mais tióis livres em A (isto é $A'-(SH)_y$), formando, assim, um conjugado. A é conforme definido no presente documento, e A' é a porção de A que não inclui a porção química tiol livre.

4. Caracterização e Seleção de ADCs anti-cKIT Desejáveis

Determinação de DAR e agregação dos ADCs

[00597] O valor de DAR do ADC cKIT foi avaliado por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS). Uma razão entre composto e anticorpo foi extrapolada a partir de dados de LC-MS para amostras reduzidas e deglicosiladas (quando adequado, isto é, quando Fc está incluído). LC-MS permite a quantificação do número médio de moléculas de carga útil de ligante (composto) fixadas a um anticorpo em uma amostra de conjugado.

[00598] Os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção foram avaliados com o uso de métodos analíticos. Tal metodologia analítica e resultados podem demonstrar que os conjugados têm propriedades

favoráveis, por exemplo, propriedades que poderiam tornar os mesmos mais fáceis de fabricar, mais fáceis de administrar aos pacientes, mais eficazes e/ou potencialmente mais seguros para os pacientes. Um exemplo é a determinação de tamanho molecular por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), em que a quantidade de espécie de anticorpo desejada em uma amostra é determinada em relação à quantidade de contaminantes com alto peso molecular (por exemplo, dímero, multímero ou anticorpo agregado) ou contaminantes com baixo peso molecular (por exemplo, fragmentos de anticorpo, produtos de degradação ou cadeias de anticorpo individuais) presentes na amostra. Em geral, é desejável ter quantidades mais altas de monômero e quantidades mais baixas, por exemplo, de anticorpo agregado devido ao impacto, por exemplo, de agregados sobre outras propriedades da amostra de anticorpo, tal como, porém sem limitação a, taxa de eliminação, imunogenicidade e toxicidade. Outro exemplo é a determinação da hidrofobicidade por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), em que a hidrofobicidade de uma amostra é analisada em relação a um conjunto de anticorpos padrão de propriedades conhecidas. Em geral, é desejável ter baixa hidrofobicidade devido ao impacto da hidrofobicidade sobre outras propriedades da amostra de anticorpo, tal como, porém sem limitação a, agregação, agregação ao longo do tempo, aderência às superfícies, hepatotoxicidade, taxas de eliminação e exposição farmacocinética. Consultar Damle, N.K., Nat Biotechnol. 2008; 26(8):884 a 885; Singh, S.K., Pharm Res. 2015; 32(11):3.541 a 3.571.

Seleção de ADCs anti-ckIT

[00599] Para selecionar ADCs anti-ckIT adequados para uso nos métodos descritos no presente documento, um ensaio de eliminação de célula-tronco hematopoiética humana *in vitro* pode ser usado para triar os ADCs anti-ckIT quanto à sua eficácia e potência. Por exemplo,

os métodos descritos no Exemplo 5 podem ser usados para triar ADCs anti-cKIT. Os ADCs anti-cKIT adequados podem ser selecionados com base em EC50, por exemplo, ADC anti-cKIT com um EC50 menor do que 500 µg/ml, por exemplo, menor do que 100 µg/ml, menor do que 50 µg/ml, menor do que 10 µg/ml ou menor do que 5 µg/ml.

[00600] Além disso, foi relatado que cKIT se expressa em mastócitos, e fator de célula-tronco (SCF), o ligante de cKIT induz degranulação direta de mastócitos peritoneais de rato *in vitro* e *in vivo* (Taylor et al., Immunology. Novembro de 1995; 86(3):427 a 433). SCF também induz a degranulação de mastócito humano *in vivo* (Costa et al., J Exp Med. 1996; 183(6): 2.681 a 2.686). Para evitar efeitos prejudiciais potenciais causados por degranulação de mastócito em recipientes de transplante, os ADCs cKIT selecionados podem ser testados quanto à sua capacidade de induzir a degranulação de mastócito *in vitro*. Por exemplo, os experimentos descritos no Exemplo 6 podem ser usados para triar ADCs cKIT, e ADCs anti-cKIT adequados podem ser selecionados com base em degranulação de mastócito mínima, por exemplo, um mostrador O.D. corrigido em linha de base menor do que 0,25, por exemplo, menor do que 0,2, menor do que 0,15 ou menor do que 0,1, em um ensaio de liberação de beta-hexosaminidase.

Anticorpo cKIT e Fragmentos de Anticorpo

[00601] A presente descrição fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) que se ligam especificamente a cKIT humano. Os anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) da presente descrição incluem, porém sem limitação, os anticorpos monoclonais humanos ou fragmentos dos mesmos descritos abaixo.

[00602] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo revelados no presente (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) têm uma capacidade reduzida de causar de-

granulação de mastócito, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores, em comparação com um anticorpo anti-cKIT de comprimento total. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) revelados no presente documento são modificados para ter capacidade reduzida de induzir degranulação de mastócito, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores. Por exemplo, os anticorpos anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) revelados no presente documento são modificados para ter uma capacidade reduzida para induzir degranulação de mastócito, ou seja, é cerca de, ou é pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% reduzida em comparação a um anticorpo anti-cKIT de comprimento total, ou um fragmento $F(ab')_2$ ou $F(ab)_2$ dos mesmos, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) revelados no presente documento podem compreender um fragmento Fab ou Fab' anti-cKIT. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos de ligação a antígeno) revelados no presente documento podem ter capacidade mínima para induzir a degranulação de mastócito, por exemplo, um mostrador de O.D. corrigido na linha de base menor do que 0,25, por exemplo, menor do que 0,2, menor do que 0,15 ou menor do que 0,1, em um ensaio de liberação de beta-hexosaminidase, mesmo quando reticulados e/ou multimerizados em complexos maiores.

[00603] Os conjugados de fármaco de anticorpo fornecidos no presente documento incluem um fragmento de anticorpo de ligação a cKIT humano (por exemplo, Fab ou Fab'). Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo fornecidos no presente docu-

mento incluem um fragmento de anticorpo humano ou humanizado (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano. Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo fornecidos no presente documento incluem um Fab' humano ou humanizado que se liga especificamente a cKIT humano. Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo fornecidos no presente documento incluem um Fab humano ou humanizado que se liga especificamente a cKIT humano.

[00604] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende um domínio VH que tem uma sequência de aminoácidos de qualquer domínio VH descrito na Tabela 1 (por exemplo, SEQ ID NO: 10, 36, 54, 69, 95). Outro anticorpo ou fragmento de anticorpo adequado (por exemplo, Fab ou Fab') pode incluir um domínio VH que tem pelo menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade de sequência com qualquer um dos domínios VH descritos na Tabela 1.

[00605] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma CDR VH (ou HCDR) que tem uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VH (ou HCDR) listadas na Tabela 1. Em aspectos particulares, a presente descrição fornece o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que compreende (ou, alternativamente, que consiste em) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VH (ou HCDR) que têm uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VH (ou HCDR) listadas na Tabela 1.

[00606] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende um domínio VL que tem uma sequência de ami-

noácidos de qualquer domínio VL descrito na Tabela 1 (por exemplo, SEQ ID NO: 23, 47, 82, 108). Outro anticorpo ou fragmento de anticorpo adequado (por exemplo, Fab ou Fab') pode incluir um domínio VL que tem pelo menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade de sequência com qualquer um dos domínios VL descritos na Tabela 1.

[00607] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma CDR VL (ou LCDR) que tem uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VL (ou LCDR) listadas na Tabela 1. Em aspectos particulares, a presente descrição fornece o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que compreende (ou, alternativamente, que consiste em) uma, duas, três, quatro, cinco ou mais CDRs VL (ou LCDR) que têm uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDRs VL (ou LCDR) listadas na Tabela 1.

[00608] Outro anticorpo anti-cKIT ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') revelado no presente documento inclui aminoácidos que sofreram mutação, tendo, ainda, pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 por cento de identidade de sequência nas regiões CDR com as regiões CDR representadas nas sequências descritas na Tabela 1. Em alguns aspectos, o mesmo inclui sequências de aminoácidos mutantes em que não maior do que 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos sofreram mutação nas regiões CDR em comparação com as regiões CDR representadas na sequência descrita na Tabela 1.

[00609] A presente descrição também fornece sequências de ácidos nucleicos que codificam VH, VL, uma cadeia pesada e uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano. Tais sequências de ácidos nucleicos podem ser otimizadas para expressão em células de

mamífero.

Tabela 1. Sequências de anticorpos anti-cKIT e fragmentos de anticorpo exemplificativos

Ab1 Anti-cKIT/Fab1/Fab'1		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	VIFPAEGAPGYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	FPAEGA
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinado)	GGTFSSY AIS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinado)	VIFPAEGAPGYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 8	HCDR2 (IMGT)	IFPAEGAP
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (IMGT)	ARGGYISDFDV
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSS
SEQ ID NO: 11	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC GTTATCTTCCCGGCTGAAGGC GCTCCGGGTACGCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATTA CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTACGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 12	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG

		LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 13	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC GTTATCTTCCCGGCTGAAGGC GCTCCGGGTTACGCCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATTA CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAAGTGTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCTGGAAGTCTGGGG CTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCGGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGA

		GCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCTGCCCAGCTCC AGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCCCCCCTAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCCGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGA CCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAATACAAGTGCAAAGTCTC CAACAAGGCCCTGCCAGCCCC AATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCC CCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCC AGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC CCCGGCAAG
SEQ ID NO: 14	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK

		STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLG
SEQ ID NO: 15	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC GTTATCTTCCCGGCTGAAGGC GCTCCGGGTTACGCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATTA CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAAGTGTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCTTGGAACTCTGGGG CTCTGACTTCCGGCGTGACACA CCTTCCCCGCGGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGA GCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCTGCCAGCTCC AGAACTGCTGGGA
SEQ ID NO: 118	Cys Fab-HC(EU221)-HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG

		TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPCPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
SEQ ID NO: 119	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCP
SEQ ID NO: 120	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAP
SEQ ID NO: 121	Fab' HC(EU236)-Pro	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGP
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Kabat)	RASQSIISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Kabat)	QYYYESIT
SEQ ID NO: 19	LCDR1 (Chothia)	SQSIISNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS

SEQ ID NO: 21	LCDR3 (Chothia)	YYYESI
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Combinado)	RASQSIISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinado)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Combinado)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 22	LCDR1 (IMGT)	QSIISNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (IMGT)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 23	VL (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 24	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCT ATTTCTAACTACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGACCTA TTATTGCCAGCAGTACTACTAC GAATCTATCACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAAG
SEQ ID NO: 25	Ab/Fab' LC (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 26	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCT ATTTCTAACTACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG

		CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGACCTA TTATTGCCAGCAGTACTACTAC GAATCTATCACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAAACG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGT GTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG AACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCA AGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SEQ ID NO: 122	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRFAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 123	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPC VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPRFAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP

		VTKSFNRGEC
Ab2 Anti-cKIT/Fab2/Fab'2		
SEQ ID NO: 27	HCDR1 (Kabat)	SHALS
SEQ ID NO: 28	HCDR2 (Kabat)	GIIPSFGTADYAQKFQG
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Kabat)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 30	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSH
SEQ ID NO: 31	HCDR2 (Chothia)	IPSFGT
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Chothia)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 32	HCDR1 (Combinado)	GGTFSSHALS
SEQ ID NO: 28	HCDR2 (Combinado)	GIIPSFGTADYAQKFQG
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Combinado)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 33	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSHA
SEQ ID NO: 34	HCDR2 (IMGT)	IIPSFGTA
SEQ ID NO: 35	HCDR3 (IMGT)	ARGLYDFDY
SEQ ID NO: 36	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSFGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 37	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTTCTTCTCATGCTCTGTCTTG GGTGCGCCAGGCCCGGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCG GTATCATCCCGTCTTTCGGCAC TGCGGACTACGCCAGAAATTT CAGGGCCGGGTGACCATTACC GCCGATGAAAGCACCAGCACC GCCTATATGGAAGTACGAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCC GTGTATTATTGCGCGCGTGGTC TGACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGT TAGCTCA
SEQ ID NO: 38	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSFGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT

		LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 39	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAAACC GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTTCTTCTCATGCTCTGTCTTG GGTGCGCCAGGCCCGGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCG GTATCATCCCGTCTTTCGGCAC TGCGGACTACGCCAGAAATTT CAGGGCCGGGTGACCATTACC GCCGATGAAAGCACCAGCACC GCCTATATGGAAGTGAAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCC GTGTATTATTGCGCGCGTGGTC TGTACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGT TAGCTCAGCTAGCACCAAGGG CCCCAGCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGT TGCTTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTT CCGGCGTGACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGC

		AACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAA GACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTACCCCAGCGA TATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCACTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCA AG
SEQ ID NO: 40	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

		NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLG
SEQ ID NO: 41	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGACAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTTCTTCTCATGCTCTGTCTTG GGTGCGCCAGGCCCGGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCG GTATCATCCCGTCTTTCGGCAC TGCGGACTACGCCCAGAAATTT CAGGGCCGGGTGACCATTACC GCCGATGAAAGCACCAGCACC GCCTATATGGAAGTGAAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCC GTGTATTATTGCGCGCGTGGTC TGTACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGT TAGCTCAGCTAGCACCAAGGG CCCCAGCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGT TGCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTT CCGGCGTGACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGA
SEQ ID NO: 124	Cys Fab-HC(EU221)-HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

		YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCD
SEQ ID NO: 125	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCP
SEQ ID NO: 126	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCP
SEQ ID NO: 127	Fab' HC(EU236)-Pro	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSHALSWVRQAPGQ GLEWMGGIIPSGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGLYDFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCP
SEQ ID NO: 42	LCDR1 (Kabat)	RASQDISQDLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 43	LCDR3 (Kabat)	QYYPST
SEQ ID NO: 44	LCDR1 (Chothia)	SQDISQD
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 45	LCDR3 (Chothia)	YYLPS
SEQ ID NO: 42	LCDR1 (Combinado)	RASQDISQDLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinado)	DASSLQS

SEQ ID NO: 43	LCDR3 (Combinado)	QQYYYPST
SEQ ID NO: 46	LCDR1 (IMGT)	QDISQD
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 43	LCDR3 (IMGT)	QQYYYPST
SEQ ID NO: 47	VL (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISQDLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFAVYYCQQY YYLPSTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 48	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGGAC ATTTCTCAGGACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGGTGTA TTATTGCCAGCAGTACTACTAC CTGCCGTCTACCTTTGGCCAG GGCACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 49	Ab/Fab' LC (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISQDLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFAVYYCQQY YYLPSTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 50	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGGAC ATTTCTCAGGACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC

		AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGGTGTA TTATTGCCAGCAGTACTACTAC CTGCCGTCTACCTTTGGCCAG GGCACGAAAGTTGAAATTAAAC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGTGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCAC CGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCAC CCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
SEQ ID NO: 128	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISQDLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQY YYLPSTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVT <u>C</u> QDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 129	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISQDLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQY YYLPSTFGQGTKVEIKRTVAAP <u>C</u> VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ab3 Anti-cKIT/Fab3/Fab'3		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SYAIS

SEQ ID NO: 51	HCDR2 (Kabat)	TIGPFEGQPRYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 52	HCDR2 (Chothia)	GPFEQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinado)	GGTFSSY AIS
SEQ ID NO: 51	HCDR2 (Combinado)	TIGPFEGQPRYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 53	HCDR2 (IMGT)	IGPFEGQP
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (IMGT)	ARGGYISDFDV
SEQ ID NO: 54	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSS
SEQ ID NO: 55	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCCGAAGTGAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC ACTATCGGTCCGTTCTGAAGGC CAGCCGCGTTACGCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATTA CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTAGCTCA
SEQ ID NO: 56	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

		LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 57	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAAGAGC GGTGCCGAAGTAAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC ACTATCGGTCCGTTCTGAAGGC CAGCCGCGTTACGCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATTA CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTC CCCTGGCCCCCAGCAGCAAGT CTAATTCCGGCGGAACTGCTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGG ACTAATTCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCTGGAAGTCTGGGG CTCTGACTTCCGGCGTGACACA CCTTCCCGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGA GCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACAC

		CTGCCCCCCTGCCAGCTCC AGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGA CCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAATACAAGTGCAAAGTCTC CAACAAGGCCCTGCCAGCCCC AATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCC CCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC CCCGGCAAG
SEQ ID NO: 58	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLG
SEQ ID NO: 59	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC

		GGTGCCGAAGTGAAAAACCG GGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC TGCAAAGCATCCGGAGGGACG TTTAGCAGCTATGCGATTAGCT GGGTGCGCCAGGCCCGGGC CAGGGCCTCGAGTGGATGGGC ACTATCGGTCCGTTCTGAAGGC CAGCCGCGTTACGCCAGAAA TTTCAGGGCCGGGTGACCATT CCGCCGATGAAAGCACCAGCA CCGCCTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTGGTTACATCTCTGACTTCGA TGTTTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTC CCCTGGCCCCCAGCAGCAAGT CTACTTCCGGCGGAAGTCTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGG ACTACTTCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCTGGAAGTCTGGGG CTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGA GCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCTGCCAGCTCC AGAACTGCTGGGA
SEQ ID NO: 130	Cys Fab HC(EU221)-HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPCPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
SEQ ID NO: 131	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC

		KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCP
SEQ ID NO: 132	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAP
SEQ ID NO: 133	Fab' HC(EU236)-Pro	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGYISDFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPPELLGP
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Kabat)	RASQSSISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Kabat)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 19	LCDR1 (Chothia)	SQSSISNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 21	LCDR3 (Chothia)	YYESI
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Combinado)	RASQSSISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinado)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Combinado)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 22	LCDR1 (IMGT)	QSSISNY

SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (IMGT)	QYYYESIT
SEQ ID NO: 23	VL (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIENYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 24	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCT ATTTCTAACTACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGACCTA TTATTGCCAGCAGTACTACTAC GAATCTATCACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 25	Ab/Fab' LC (capa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIENYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRFAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 26	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGC CCGAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATCGCGTGACCATT ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCT ATTTCTAACTACCTGGCTTGGT ACCAGCAGAAACCGGGCAAAG CGCCGAAACTATTAATCTACGA CGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGC GTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATTAGCTCTCTGC AACCGGAAGACTTTGCGACCTA

		TTATTGCCAGCAGTACTACTAC GAATCTATCACCTTTGGCCAGG GCACGAAAGTTGAAATTAAACG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGT GTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG AACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCA AGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SEQ ID NO: 134	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTCQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 135	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YYESITFGQGTKVEIKRTVAAPC VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ab4 Anti-cKIT/Fab4/Fab'4		
SEQ ID NO: 60	HCDR1 (Kabat)	TNSAAWN
SEQ ID NO: 61	HCDR2 (Kabat)	RIYYRSQWLNDYAVSVKS
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Kabat)	QLTYPYTVYHKALDV

SEQ ID NO: 63	HCDR1 (Chothia)	GDSVSTNSA
SEQ ID NO: 64	HCDR2 (Chothia)	YYRSQWL
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Chothia)	QLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Combinado)	GDSVSTNSAAWN
SEQ ID NO: 61	HCDR2 (Combinado)	RIYYRSQWLNDYAVSVKS
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Combinado)	QLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 66	HCDR1 (IMGT)	GDSVSTNSAA
SEQ ID NO: 67	HCDR2 (IMGT)	IYYRSQWLN
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (IMGT)	ARQLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 69	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTC AISGDSVSTNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 70	VH DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGC GGTCCGGGCCTGGTGAAACCG AGCCAGACCCTGAGCCTGACC TGCGCGATTTCCGGAGATAGC GTGAGCACTAACTCTGCTGCTT GGAAGTGGATTCGTCAGAGCC CGAGCCGTGGCCTCGAGTGGC TGGGCCGTATCTACTACCGTAG CCAGTGGCTGAACGACTATGC CGTGAGCGTGAAAAGCCGCAT TACCATTAACCCGGATACTTCG AAAAACCAGTTTAGCCTGCAAC TGAACAGCGTGACCCCGGAAG ATACGGCCGTGTATTATTGCGC GCGTCAGCTGACTTACCCGTAC ACTGTTTACCATAAAGCTCTGG ATGTTTGGGGTCAAGGAACCT GGTCACCGTCTCCTCG
SEQ ID NO: 71	Ab HC	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTC AISGDSVSTNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

		PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 72	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGC GGTCCGGGCCTGGTGAACCG AGCCAGACCCTGAGCCTGACC TCGCGGATTTCGGAGATAGC GTGAGCACTAACTCTGCTGCTT GGAAGTGGATTCGTCAGAGCC CGAGCCGTGGCCTCGAGTGGC TGGGCCGTATCTACTACCGTAG CCAGTGGCTGAACGACTATGC CGTGAGCGTGAAAAGCCGCAT TACCATTAACCCGGATACTTCG AAAAACCAGTTTAGCCTGCAAC TGAACAGCGTGACCCCGGAAG ATACGGCCGTGTATTATTGCGC GCGTCAGCTGACTTACCCGTAC ACTGTTTACCATAAAGCTCTGG ATGTTTGGGGTCAAGGAACCCCT GGTCACCGTCTCCTCGGCTAG CACCAAGGGCCCCAGCGTGT CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GTCTACTTCCGGCGGAACTGCT GCCCTGGGTTGCCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACAGTGTCTTGGAAGTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCC TCCAGCTCTCTGGGAACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAGACCCACA

		CCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTT CCGTGTTCTGTTCCCCCCAA GCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGTC CCACGAGGACCCAGAGGTGAA GTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAA GACCAAGCCCAGAGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCACGGG AGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCAGCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACACTACAAGACCACC CCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCA GGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGA GCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 73	Fab' HC (EU236)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTC AISGDSVSTNSAAWNWIQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
SEQ ID NO: 74	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGC

		GGTCCGGGCCTGGTGAAACCG AGCCAGACCCTGAGCCTGACC TGCGCGATTTCCGGAGATAGC GTGAGCACTAACTCTGCTGCTT GGAAGTGGATTCGTCAGAGCC CGAGCCGTGGCCTCGAGTGGC TGGGCCGTATCTACTACCGTAG CCAGTGGCTGAACGACTATGC CGTGAGCGTGAAAAGCCGCAT TACCATTAACCCGGATACTTCG AAAAACCAGTTTAGCCTGCAAC TGAACAGCGTGACCCCGGAAG ATACGGCCGTGTATTATTGCGC GCGTCAGCTGACTTACCCGTAC ACTGTTTACCATAAAGCTCTGG ATGTTTGGGGTCAAGGAACCT GGTCACCGTCTCCTCGGCTAG CACCAAGGGCCCCAGCGTGT CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GTCTACTTCCGGCGGAAGTGT GCCCTGGGTGCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACAGTGTCTGGAAGTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCC TCCAGCTCTCTGGGAACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGA
SEQ ID NO: 136	Cys Fab HC(EU221)-HC-E152C (EU)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTC AISGDSVSTNSAAWNWIQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPQPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE

		PKSCD
SEQ ID NO: 137	Fab' HC(EU230)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLC AISGDSVSTNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 138	Fab' HC(EU232)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLC AISGDSVSTNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAP
SEQ ID NO: 139	Fab' HC(EU236)-Pro	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLC AISGDSVSTNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVS VKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARQLTYPYTVYHKA LDVWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGP
SEQ ID NO: 75	LCDR1 (Kabat)	SGDNLGDQYVS
SEQ ID NO: 76	LCDR2 (Kabat)	DDTDRPS
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (Kabat)	QSTD SKSVV
SEQ ID NO: 78	LCDR1 (Chothia)	DNLGDQY
SEQ ID NO: 79	LCDR2 (Chothia)	DDT
SEQ ID NO: 80	LCDR3 (Chothia)	TDSKSV
SEQ ID NO: 75	LCDR1 (Combinado)	SGDNLGDQYVS
SEQ ID NO: 76	LCDR2 (Combinado)	DDTDRPS
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (Combinado)	QSTD SKSVV

SEQ ID NO: 81	LCDR1 (IMGT)	NLGDQY
SEQ ID NO: 79	LCDR2 (IMGT)	DDT
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (IMGT)	QSTD SKSVV
SEQ ID NO: 82	VL (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNLGDQYVSWYQQKPGQAPV LVIYDDTDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAEDEADYYCQST DSKSVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 83	VL DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCG CCGAGCGTGAGCGTGAGCCCG GGCCAGACCGCGAGCATTACC TG TAGCGGCGATAACCTGGGT GACCAATACGTTTCTTGGTACC AGCAGAAACCGGGCCAGGCGC CGGTGCTGGTGATCTACGACG ACACTGACCGTCCGAGCGGCA TCCCGGAACGTTTTAGCGGATC CAACAGCGGCAACACCGCGAC CCTGACCATTAGCGGCACCCA GGCGGAAGACGAAGCGGATTA T TACTGCCAGTCTACTGACTCT AAATCTGTTGTGTTTGGCGGCG GCACGAAGTTAACCGTCCTA
SEQ ID NO: 84	Ab/Fab' LC (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNLGDQYVSWYQQKPGQAPV LVIYDDTDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAEDEADYYCQST DSKSVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
SEQ ID NO: 85	Ab/Fab' LC DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCG CCGAGCGTGAGCGTGAGCCCG GGCCAGACCGCGAGCATTACC TG TAGCGGCGATAACCTGGGT GACCAATACGTTTCTTGGTACC AGCAGAAACCGGGCCAGGCGC CGGTGCTGGTGATCTACGACG ACACTGACCGTCCGAGCGGCA TCCCGGAACGTTTTAGCGGATC CAACAGCGGCAACACCGCGAC CCTGACCATTAGCGGCACCCA

		GGCGGAAGACGAAGCGGATTA TTACTGCCAGTCTACTGACTCT AAATCTGTTGTGTTTGGCGGCG GCACGAAGTTAACCGTCCTAG GCCAGCCTAAGGCCGCTCCCT CCGTGACCCTGTTCCCCCCCCA GCTCCGAGGAACTGCAGGCCA ACAAGGCCACCCTGGTGTGCC TGATCAGCGACTTCTACCCTGG CGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGACAGCAGCCCCGTGAA GGCCGGCGTGGAGACAACCAC CCCCAGCAAGCAGAGCAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTA CCTGAGCCTGACCCCCGAGCA GTGGAAGAGCCACAGAAGCTA CAGCTGCCAGGTCACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAGAAAAC CGTGGCCCCCACCAGTGCAG C
SEQ ID NO: 140	Cys Fab-LC (lambda)- A143C (EU)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNLGDQYVSWYQQKPGQAPV LVIYDDTDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAEDEADYYCQST DSKSVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGCVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
Ab5 Anti-cKIT/Fab5/Fab'5		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	NYWIA
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Kabat)	IIYPSNSYTLYSPSFQG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	VPPGGSISYPAFDH
SEQ ID NO: 89	HCDR1 (Chothia)	GYSFTNY
SEQ ID NO: 90	HCDR2 (Chothia)	YPSNSY
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	VPPGGSISYPAFDH
SEQ ID NO: 91	HCDR1 (Combinado)	GYSFTNYWIA
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Combinado)	IIYPSNSYTLYSPSFQG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Combinado)	VPPGGSISYPAFDH
SEQ ID NO: 92	HCDR1 (IMGT)	GYSFTNYW
SEQ ID NO: 93	HCDR2 (IMGT)	IYPSNSYT

SEQ ID NO: 94	HCDR3 (IMGT)	ARVPPGGSISYPAFDH
SEQ ID NO: 95	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVPPGGSISYPAFDHW GQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 96	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCGGAAGTGAAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTT CACTAACTACTGGATCGCTTGG GTGCGCCAGATGCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGATGGGCATC ATCTACCCGTCTAACAGCTACA CCCTGTATAGCCCGAGCTTTCA GGGCCAGGTGACCATTAGCGC GGATAAAAGCATCAGCACCGC GTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATACCGCGAT GTATTATTGCGCGCGTGTTCCG CCGGGTGGTTCTATCTCTTACC CGGCTTTCGATCATTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGACTGTTA GCTCA
SEQ ID NO: 97	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVPPGGSISYPAFDHW GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

		CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO: 98	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCGGAAGTGAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTT CACTAACTACTGGATCGCTTGG GTGCGCCAGATGCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGATGGGCATC ATCTACCCGTCTAACAGCTACA CCCTGTATAGCCCGAGCTTTCA GGGCCAGGTGACCATTAGCGC GGATAAAAGCATCAGCACCGC GTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATACCGCGAT GTATTATTGCGCGCGTGTTCGG CCGGGTGGTTCTATCTCTTACC CGGCTTTTCGATCATTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGACTGTTA GCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGTCTACTTCCG GCGGAACTGCTGCCCTGGGTT GCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTT CCGGCGTGACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGGCCTTCCGTGTTCTTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ACAACGCCAAGACCAAGCCCA

		GAGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAA GACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTACCCCAGCGA TATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCA AG
SEQ ID NO: 99	Fab' HC (EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQQQ VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVPPGGSISYPAFDHW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLG
SEQ ID NO: 100	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGC GGTGCGGAAGTGAAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTT CACTAACTACTGGATCGCTTGG GTGCGCCAGATGCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGATGGGCATC ATCTACCCGTCTAACAGCTACA CCCTGTATAGCCCGAGCTTTCA GGGCCAGGTGACCATTAGCGC

		GGATAAAAGCATCAGCACCGC GTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATACCGCGAT GTATTATTGCGCGCGTGTTCCG CCGGGTGGTTCTATCTCTTACC CGGCTTTCGATCATTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGA CTGTTA GCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGTCTACTTCCG GCGGAACTGCTGCCCTGGGTT GCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCT GGA ACTCTGGGGCTCTGACTT CCGGCGTGACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGA
SEQ ID NO: 141	Cys Fab HC(EU221)-HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVPPGGSISYPAFDHW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPQ PVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC D
SEQ ID NO: 142	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVPPGGSISYPAFDHW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

		SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCP
SEQ ID NO: 143	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSSLKASDT AMYYCARVPPGGISYPAFDHW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAP
SEQ ID NO: 144	Fab' HC(EU236)-Pro	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTNYWIAWVRQMPGKG LEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSSLKASDT AMYYCARVPPGGISYPAFDHW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGP
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSIYAS
SEQ ID NO: 102	LCDR2 (Kabat)	RDNKRPS
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (Kabat)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 104	LCDR1 (Chothia)	DNIGSIY
SEQ ID NO: 105	LCDR2 (Chothia)	RDN
SEQ ID NO: 106	LCDR3 (Chothia)	TDMEQHS
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (Combinado)	SGDNIGSIYAS
SEQ ID NO: 102	LCDR2 (Combinado)	RDNKRPS
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (Combinado)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 107	LCDR1 (IMGT)	NIGSIY
SEQ ID NO: 105	LCDR2 (IMGT)	RDN
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (IMGT)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 108	VL (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNIGSIYASWYQQKPGQAPVL VIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCSVTD MEQHSVFEGGKLTVL

SEQ ID NO: 109	VL DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCG CCGAGCGTGAGCGTGAGCCCG GGCCAGACCGCGAGCATTACC TGTAGCGGCGATAACATCGGTT CTATCTACGCTTCTTGGTACCA GCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACCGTGA CAACAAACGTCCGAGCGGCAT CCCGGAACGTTTTAGCGGATC CAACAGCGGCAACACCGCGAC CCTGACCATTAGCGGCACCCA GGCGGAAGACGAAGCGGATTA TACTGCTCCGTTACTGACATG GAACAGCATTCTGTGTTTGGCG GCGGCACGAAGTTAACCGTCC TA
SEQ ID NO: 110	Ab/Fab' LC (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNIGSIYASWYQQKPGQAPVL VIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCSVTD MEQHSVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
SEQ ID NO: 111	Ab/Fab' LC DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCG CCGAGCGTGAGCGTGAGCCCG GGCCAGACCGCGAGCATTACC TGTAGCGGCGATAACATCGGTT CTATCTACGCTTCTTGGTACCA GCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACCGTGA CAACAAACGTCCGAGCGGCAT CCCGGAACGTTTTAGCGGATC CAACAGCGGCAACACCGCGAC CCTGACCATTAGCGGCACCCA GGCGGAAGACGAAGCGGATTA TACTGCTCCGTTACTGACATG GAACAGCATTCTGTGTTTGGCG GCGGCACGAAGTTAACCGTCC TAGGCCAGCCTAAGGCCGCTC CCTCCGTGACCCTGTTCCCCC CCAGCTCCGAGGAACTGCAGG

		CCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCC TGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGT GAAGGCCGGCGTGGAGACAAC CAACCAAGTACGCCGCCAGCAG CTACCTGAGCCTGACCCCCGA GCAGTGAAGAGCCACAGAAG CTACAGCTGCCAGGTCACCCA CGAGGGCAGCACCGTGGAGAA AACCGTGGCCCCCACCAGGTG CAGC
SEQ ID NO: 145	Cys Fab-LC (lambda)- A144C (EU)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCS GDNIGSIYASWYQQKPGQAPVL VIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCSVTD MEQHSVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGQVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[00610] Outro anticorpo anti-cKIT ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') revelado no presente documento inclui aqueles em que os aminoácidos ou ácidos nucleicos que codificam os aminoácidos sofreram mutação, tendo, ainda, pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 por cento de identidade às sequências descritas na Tabela 1. Em alguns aspectos, o mesmo inclui sequências de aminoácidos mutantes em que não maior do que 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos sofreram mutação nas regiões variáveis em comparação com as regiões variáveis representadas na sequência descrita na Tabela 1, enquanto mantêm substancialmente a mesma atividade terapêutica.

[00611] Visto que cada um desses anticorpos ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pode se ligar a cKIT, as sequências de cadeia pesada e cadeia leve VH, VL (sequências de aminoácidos e sequências de nucleotídeos que codificam as sequências de aminoá-

cidos) podem ser "misturadas e correspondidas" para criar outro anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT. Tal anticorpo ou fragmento de anticorpo "misturado ou correspondido" (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT pode ser testado com o uso dos ensaios de ligação conhecidos na técnica (por exemplo, ELISAs e outros ensaios descritos na seção de Exemplos). Quando essas cadeias são misturadas e correspondidas, uma sequência VH de um pareamento VH/VL particular deve ser substituída por uma sequência VH estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência de cadeia pesada de um pareamento de cadeia pesada / cadeia leve particular deve ser substituída por uma sequência de cadeia pesada estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência VL de um pareamento VH/VL particular deve ser substituída por uma sequência VL estruturalmente similar. Similarmente, uma sequência de cadeia leve de um pareamento de cadeia pesada / cadeia leve particular deve ser substituída por uma sequência de cadeia leve estruturalmente similar.

[00612] Consequentemente, em um aspecto, a descrição fornece um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que tem: uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 36, 54, 69 e 95 (Tabela 1); e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 23, 47, 82 e 108 (Tabela 1); em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') se liga especificamente a cKIT humano.

[00613] Em outro aspecto, a descrição fornece um anticorpo isolado que tem: uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 38, 56, 71 e 97; e uma cadeia leve que compreende uma sequên-

cia de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25, 49, 84 e 110.

[00614] Em outro aspecto, a descrição fornece um fragmento de anticorpo isolado (por exemplo, Fab') que tem: uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14, 40, 58, 73 e 99; e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25, 49, 84 e 110.

[00615] Em outro aspecto, a presente descrição fornece anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT que compreende a cadeia pesada e cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s conforme descrito na Tabela 1, ou combinações das mesmas. As sequências de aminoácidos das CDR1s VH (ou HCDR1) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 1, 4, 6, 7, 27, 30, 32, 33, 60, 63, 65, 66, 86, 89, 91 e 92. As sequências de aminoácidos das CDR2s VH (ou HCDR2) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 28, 31, 34, 51, 52, 53, 61, 64, 67, 87, 90 e 93. As sequências de aminoácidos das CDR3s VH (ou HCDR3) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 3, 9, 29, 35, 62, 68, 88 e 94. As sequências de aminoácidos das CDR1s VL (ou LCDR1) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 16, 19, 22, 42, 44, 46, 75, 78, 81, 101, 104 e 107. As sequências de aminoácidos das CDR2s VL (ou LCDR2) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 17, 20, 76, 79, 102 e 105. As sequências de aminoácidos das CDR3s VL (ou LCDR3) dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') são mostradas nas SEQ ID NOs: 18, 21, 43, 45, 77, 80, 103 e 106.

[00616] Dado que cada um desses anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pode se ligar a cKIT humano e que a especificidade de ligação a antígeno é fornecida principalmente pelas regiões CDR1, 2 e 3, as sequências de VH CDR1, 2 e 3 (ou HCDR1, 2, 3) e sequências de VL CDR1, 2 e 3 (ou LCDR1, 2, 3) podem ser "misturadas e correspondidas " (isto é, CDRs de diferentes anticorpos podem ser misturadas e correspondidas, embora cada anticorpo precise conter uma VH CDR1, 2 e 3 e uma VL CDR1, 2 e 3 para criar um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT. Tal anticorpo ou fragmento de anticorpo "misturado ou correspondido" (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT pode ser testado com o uso dos ensaios de ligação conhecidos na técnica. Quando as sequências de VH CDR são misturadas e correspondidas, 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(es). Similarmente, quando as sequências VL CDR são misturadas e correspondidas, 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(es). 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 com sequências estruturalmente similares das sequências de CDR mostradas no presente documento.

[00617] Consequentemente, a presente descrição fornece um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que compreende uma cadeia pesada CDR1 (HCDR1) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1, 4, 6, 7, 27, 30, 32, 33, 60, 63, 65, 66, 86, 89, 91 e 92; uma CDR2 de cadeia pesada (HCDR2) que compreende

uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 28, 31, 34, 51, 52, 53, 61, 64, 67, 87, 90 e 93; uma CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 9, 29, 35, 62, 68, 88 e 94; uma CDR1 de cadeia leve (LCDR1) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16, 19, 22, 42, 44, 46, 75, 78, 81, 101, 104 e 107; uma CDR2 de cadeia leve (LCDR2) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 17, 20, 76, 79, 102 e 105; e uma CDR3 de cadeia leve (LCDR3) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 21, 43, 45, 77, 80, 103 e 106; em que o anticorpo se liga especificamente a cKIT.

[00618] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 1, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00619] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 5; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[00620] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID

NO:16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00621] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 8; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00622] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 27, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00623] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 30, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 31; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 44; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 45.

[00624] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 32, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00625] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 33, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 34; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 35; uma LCDR1 de SEQ

ID NO: 46; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00626] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 1, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00627] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 52; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[00628] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00629] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 53; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00630] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 60, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ

ID NO: 75; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00631] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 63, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 64; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 78; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 80.

[00632] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 65, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00633] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 66, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 67; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 68; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 81; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00634] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 86, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00635] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 89, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 90; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ

ID NO: 104; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 106.

[00636] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 91, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00637] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma HCDR1 de SEQ ID NO: 92, uma HCDR2 de SEQ ID NO: 93; uma HCDR3 de SEQ ID NO: 94; uma LCDR1 de SEQ ID NO: 107; uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105; e uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00638] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma região variável de cadeia leve (VL) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[00639] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

[00640] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[00641] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[00642] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 108.

[00643] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00644] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00645] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00646] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00647] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[00648] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 119, 120 ou 121, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00649] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 125, 126, ou 127, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00650] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 131, 132, ou 133, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00651] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 137, 138, ou 139, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00652] Em algumas modalidades, o fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab') que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 142, 143, ou 144, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:

110.

[00653] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00654] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00655] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00656] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00657] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[00658] Em certos aspectos, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a cKIT humano é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') descrito na Tabela 1.

1. Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epítopo

[00659] A presente descrição fornece o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga especificamente a um epítopo dentro do domínio extracelular do receptor de cKIT humano. Em certos aspectos, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pode se ligar a um epítopo dentro dos domínios 1 a 3 do domínio extracelular de cKIT humano.

[00660] A presente descrição também fornece anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo anti-cKIT ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') descrito na Tabela 1. O anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') adicional pode ser, portanto, identificado com base em sua capacidade de competição cruzada (por exemplo, para inibir competitivamente a ligação de, de uma maneira estatisticamente significativa) com outro anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') em ensaios de ligação a cKIT. Um processo de alto rendimento para anticorpos "binning" com base em sua competição cruzada é descrito no Pedido de Patente Internacional nº WO 2003/48731. A capacidade de um anticorpo de teste ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') de inibir a ligação de anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') revelado no presente documento a uma proteína cKIT (por exemplo, cKIT humano) demonstra que o anticorpo de teste ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pode competir com esse anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pela ligação a cKIT; tal anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') pode, de acordo com uma teoria não limitante, se ligar a um epítopo igual ou relacionado (por exemplo, estruturalmente similar ou espacialmente proximal) na proteína cKIT como o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') com o qual o mesmo compe-

te. Em um certo aspecto, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') que se liga ao mesmo epítopo em cKIT como o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') revelado no presente documento é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') humano ou humanizado. Tal anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') humano ou humanizado pode ser preparado e isolado conforme descrito no presente documento.

2. Modificação da Estrutura principal

[00661] Os conjugados de anticorpo e fármaco revelados no presente documento podem compreender anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') de ligação a cKIT modificado que compreende modificações aos resíduos de estrutura principal dentro de VH e/ou VL, por exemplo, para melhorar as propriedades do conjugado de anticorpo e fármaco.

[00662] Em algumas modalidades, as modificações de estrutura principal são realizadas para diminuir a imunogenicidade de um anticorpo ou conjugado de anticorpo e fármaco. Por exemplo, uma abordagem é "mutação reversa" de um ou mais resíduos de estrutura principal a uma sequência de linhagem germinativa correspondente. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se sequências de estrutura principal de anticorpo a sequências de linhagem germinativa das quais o anticorpo é derivado. Para "corresponder" sequências de região de estrutura principal à configuração de linhagem germinativa desejada, os resíduos podem sofrer "mutação reversa" a uma sequência de linhagem germinativa correspondente, por exemplo, por mutagênese sítio-dirigida. Tais anticorpos ou conjugados de fármaco de anticorpo "com mutação reversa" são também destinados a serem abrangidos pela invenção.

[00663] Outro tipo de modificação de estrutura principal envolve

realizar mutação de um ou mais resíduos dentro da região de estrutura principal ou mesmo dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover epítomos de célula T para, assim, reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo ou conjugado de anticorpo e fármaco. Essa abordagem é também denominada "desimunização" e é descrita em mais detalhes na Publicação de Patente nº 2003/0153043 por Carr *et al.*

[00664] Adicional ou alternativamente às modificações realizadas dentro das regiões de estrutura principal ou CDR, os anticorpos podem ser geneticamente modificados para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como meia-vida sérica, fixação de complemento. Além disso, um anticorpo 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 um desses aspectos é descrito em mais detalhes abaixo.

[00665] Em um aspecto, a região de dobradiça de CH1 é modificada 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, para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo ou para permitir a conjugação a outra molécula.

[00666] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') revelado no presente documento inclui resíduos de aminoácido modificados ou geneticamente modificados, por exemplo, um ou mais resíduos de cisteína, como sítios para a conjugação de uma porção química de fármaco (Junutula JR, *et al.*: Nat Biotechnol 2008, 26:925 a 932). Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por

exemplo, Fab ou Fab') que compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos por cisteína nas posições descritas no presente documento. Sítios para substituição de cisteína estão nas regiões constantes do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') e são, assim, aplicáveis a uma variedade de anticorpos ou fragmento de anticorpos (por exemplo, Fab ou Fab'), e os sítios 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. Os 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 determinadas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre as posições 121, 124, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189 e 207 de uma cadeia pesada do fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU. Em determinadas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com

cisteína em sua região constante selecionada dentre as posições 124, 152, 153, 155, 157, 164, 174, 189 e 207 de uma cadeia pesada do fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

[00667] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos por cisteína na sua região constante selecionada dentre as posições 107, 108, 109, 114, 126, 127, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 157, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 188, 197, 199, e 203 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre posições 107, 108, 114, 126, 127, 129, 142, 159, 161, 165, 183 e 203 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana. . Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre posições 114, 129, 142, 145, 152, 159, 161, 165 e 197 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante se-

leccionada dentre posições 107, 108, 109, 126, 143, 145, 152, 154, 156, 157, 159, 182, 183, 188, 197, 199, e 203 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre posições 145, 152 e 197 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre posições 114 e 165 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve capa humana.

[00668] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada dentre posições 143, 145, 147, 156, 159, 163, 168 de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína na posição 143 (pela numeração de EU) de uma cadeia leve do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'), em que a cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana.

[00669] Em determinadas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende uma combinação de substituição de dois ou mais aminoácidos com cisteína em suas regiões constantes e a combinação de posições pode ser selecionada dentre qualquer uma das posições listadas acima.

[00670] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em uma ou mais das seguintes posições: posição 124 da cadeia pesada, posição 152 da cadeia pesada, posição 153 da cadeia pesada, posição 155 da cadeia pesada, posição 157 da cadeia pesada, posição 164 da cadeia pesada, posição 174 da cadeia pesada, posição 114 da cadeia leve, posição 129 da cadeia leve, posição 142 da cadeia leve, posição 159 da cadeia leve, posição 161 da cadeia leve ou posição 165 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em quatro das seguintes posições: posição 124 da cadeia pesada, posição 152 da cadeia pesada, posição 153 da cadeia pesada, posição 155 da cadeia pesada, posição 157 da cadeia pesada, posição 164 da cadeia pesada, posição 174 da cadeia pesada, posição 114 da cadeia leve, posição 129 da cadeia leve, posição 142 da cadeia leve, posição 159 da cadeia leve, posição 161 da cadeia leve ou posição 165 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa.

[00671] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína na posição 152 da cadeia pesada, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') com-

preende cisteína na posição 124 da cadeia pesada, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína na posição 165 da cadeia leve, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína na posição 114 da cadeia leve, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína na posição 143 da cadeia leve, em que a posição é numerada de acordo com o sistema EU e em que a cadeia leve é uma cadeia lambda.

[00672] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteínas na posição 152 da cadeia pesada e na posição 165 da cadeia leve e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteínas na posição 152 da cadeia pesada e na posição 114 da cadeia leve e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteínas na posição 152 da cadeia pesada e na posição 143 da cadeia leve e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia lambda. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteínas na posição 124 e na posição 152 da ca-

deia pesada e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

[00673] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em uma ou mais das seguintes posições: posição 155 da cadeia pesada, posição 189 da cadeia pesada, posição 207 da cadeia pesada, posição 145 da cadeia leve, posição 152 da cadeia leve, ou posição 197 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que uma cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4) das seguintes posições: posição 155 da cadeia pesada, posição 189 da cadeia pesada, posição 207 da cadeia pesada, posição 145 da cadeia leve, posição 152 da cadeia leve, ou posição 197 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que uma cadeia leve é uma cadeia capa.

[00674] Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em uma ou mais das seguintes posições: posição 124 da cadeia pesada, posição 152 da cadeia pesada, posição 153 da cadeia pesada, posição 155 da cadeia pesada, posição 157 da cadeia pesada, posição 164 da cadeia pesada, posição 174 da cadeia pesada, posição 114 da cadeia leve, posição 129 da cadeia leve, posição 142 da cadeia leve, posição 159 da cadeia leve, posição 161 da cadeia leve ou posição 165 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa. Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab ou Fab') compreende cisteína em duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4) das seguintes posições: posição 124 da

cadeia pesada, posição 152 da cadeia pesada, posição 153 da cadeia pesada, posição 155 da cadeia pesada, posição 157 da cadeia pesada, posição 164 da cadeia pesada, posição 174 da cadeia pesada, posição 114 da cadeia leve, posição 129 da cadeia leve, posição 142 da cadeia leve, posição 159 da cadeia leve, posição 161 da cadeia leve ou posição 165 da cadeia leve, e em que as posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a cadeia leve é uma cadeia capa.

[00675] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 122.

[00676] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

[00677] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

[00678] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

[00679] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT huma-

no compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 134.

[00680] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.

[00681] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 136, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

[00682] Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo modificado (por exemplo, Fab) que se liga especificamente a cKIT humano compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

3. Produção dos Anticorpos ou Fragmentos de Anticorpo cKIT

[00683] O anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') pode ser produzido por qualquer meio conhecido na técnica, incluindo, porém sem limitação, expressão recombinante, síntese química ou digestão enzimática de anticorpos monoclonais de comprimento total, que podem ser obtidos, por exemplo, por hibridoma ou produção recombinante. A expressão recombinante pode ser de quaisquer células hospedeiras apropriadas conhecidas na técnica, por exemplo, células hospedeiras de mamíferos, células hospedeiras bacterianas, células hospedeiras de levedura, células hospedeiras de inseto ou produzidas por um sistema sem célula (por exemplo, a Plataforma Sutro's Xpress CF™,

<http://www.sutro.bio.com/technology/>).

[00684] A descrição fornece adicionalmente polinucleotídeos que codificam o anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab') descrito no presente documento, por exemplo, polinucleotídeos que codificam regiões variáveis de cadeia pesada ou leve ou segmentos que compreendem as regiões determinantes de complementaridade conforme descrito no presente documento. Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada (VH) 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 dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 11, 37, 55, 70 e 96. Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica as regiões variáveis de cadeia leve (VL) 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 dentre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 24, 48, 83 e 109.

[00685] Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada de anticorpo 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 NOs: 13, 39, 57, 72 e 98. Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica a cadeia leve de anticorpo 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 NOs: 26, 50, 85 e 111.

[00686] Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada de Fab' 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 NOs:

15, 41, 59, 74 e 100. Em alguns aspectos, o polinucleotídeo que codifica a cadeia leve de Fab' 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 NOs: 26, 50, 85 e 111.

[00687] Os polinucleotídeos da presente descrição podem codificar apenas a sequência de região variável de um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab'). Os mesmos podem também codificar tanto uma região variável quanto uma região constante do anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab ou Fab'). Algumas das sequências de polinucleotídeos codificam um polipeptídeo que compreende regiões variáveis tanto de uma cadeia pesada quanto de uma cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT exemplificado (por exemplo, Fab ou Fab').

[00688] 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 descrito nos Exemplos abaixo) que codifica um anticorpo anti-cKIT 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.

[00689] São também fornecidos na presente descrição vetores de expressão e células hospedeiras para produzir o anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') descrito acima. Vários vetores de expressão podem ser empregados para expressar os polinucleotídeos que codificam o anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab'). Vetores de expressão com base viral e não virais podem ser usados para produzir os anticorpos em uma célula hospedeira de mamífero. Os sistemas e vetores não virais incluem plasmídeos, vetores epissômicos, 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-cKIT em células de mamíferos (por exemplo, seres humanos) incluem pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/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 da Floresta Semliki (SFV). Consultar, Brent *et al.*, supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; e Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

[00690] 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 um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab'). Em alguns aspectos, 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 enviesar as sequências de codificação cujos produtos de expressão são mais bem tolerados pelas células hospedeiras. Adicionalmente aos promotores, outros elementos reguladores podem também ser exigidos ou desejados para expressão eficiente de um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab'). Esses elementos incluem tipicamente um códon de iniciação de ATG e sítio 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.

[00691] 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 ou fragmento de anticorpo anti-cKIT inseridas (por exemplo, Fab ou Fab'). Mais frequentemente, as sequências de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT inseridas (por exemplo, Fab ou Fab') 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 ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') também codificam, algumas vezes, regiões constantes ou partes das mesmas. Tais vetores permitem a expressão das regiões variáveis como proteínas de fusão com as regi-

ões constantes levando, assim, à produção de anticorpos intatos ou fragmentos dos mesmos.

[00692] As células hospedeiras para abrigar e expressar as cadeias de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') podem ser ou procarióticas ou eucarióticas. *E. coli* é um hospedeiro procariótico útil para clonar e expressar os polinucleotídeos da presente descrição. 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, pode-se também produzir 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 sítio 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 de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab'). Células de inseto em combinação com vetores de baculovírus podem também ser usadas.

[00693] Em outros aspectos, células hospedeiras de mamíferos são usadas para expressar e produzir os polipeptídeos de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') da presente descrição. 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 confor-

me descrito 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 imortal normal ou anormal. Por exemplo, várias linhagens de células hospedeiras adequadas com a capacidade para secretar imunoglobulinas intatas foram desenvolvidas, 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 discutida geralmente 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 (consultar, por exemplo, Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 a 68, 1986), e sítios de informações de processamento necessários, tais como sítios de ligação a ribossomo, sítios de splicing de RNA, sítios de poliadenilação e sequências terminadoras transcricionais. Esses vetores de expressão usualmente 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 pol III, 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.

[00694] 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 para outros hospedeiros celulares (consultar, de modo geral, Sambrook *et al.*, supra). Outros métodos incluem, por exemplo, eletroporação, tratamento com fosfato de cálcio, transformação mediada por lipossoma, injeção e microinjeção, métodos balísticos, virossomas, imunolipossomas, conjugados de polícatión: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, as linhagens celulares que expressam estávelmente cadeias de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT (por exemplo, Fab ou Fab') podem ser preparadas com o uso de vetores de expressão 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 crescer 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 o crescimento de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas em meios seletivos. Células resistentes estávelmente transfectadas podem ser proliferadas com o uso de técnicas de cultura de tecido adequadas para o tipo de célula.

[00695] Fragmentos de anticorpo, tais como Fab ou Fab', podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, com o uso de enzimas, tais como papaína (para produzir fragmentos de Fab), ou pepsina (para produzir fragmentos de Fab'), etc.

Em comparação aos fragmentos de Fab, os fragmentos de Fab' também contêm uma região de dobradiça que inclui as duas cisteínas naturais que formam ligações de dissulfeto entre duas cadeias pesadas de uma molécula de imunoglobulina.

Usos Terapêuticos

[00696] Os conjugados da presente descrição são úteis em uma variedade de aplicações incluindo, porém sem limitação, para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas, por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética. Consequentemente, são fornecidos no presente documento métodos para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas administrando-se ao paciente uma quantidade eficaz de qualquer um dos conjugados descritos no presente documento. São também fornecidos no presente documento métodos de condicionamento de um paciente de transplante de célula-tronco hematopoiética (por exemplo, um recipiente de transplante) administrando-se ao paciente uma quantidade eficaz de qualquer um dos conjugados descritos no presente documento e permitindo um período de tempo suficiente para que os conjugados sejam eliminados da circulação do paciente antes de realizar o transplante de célula-tronco hematopoiética ao paciente. Os conjugados podem ser administrados ao paciente por via intravenosa. É também fornecido o uso de qualquer um dos conjugados ou das composições farmacêuticas descritas no presente documento para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas. É adicionalmente fornecido o uso de qualquer um dos conjugados ou das composições farmacêuticas descritas no presente documento na fabricação de um medicamento para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas.

[00697] As células-tronco hematopoiéticas endógenas usualmente

residem dentro de sinusoides de medula óssea. Esse ambiente físico em que as células-tronco residem é denominado microambiente de células-tronco ou nicho de células-tronco. As células estromais e outras envolvidas nesse nicho fornecem fatores solúveis e ligados que têm uma pluralidade de efeitos. Vários modelos foram propostos para a interação entre células-tronco hematopoiéticas e seu nicho. Por exemplo, um modelo foi sugerido em que, quando uma célula-tronco se divide, apenas uma filha permanece no nicho e a outra célula filha sai do nicho para se diferenciar. Foi proposto que a eficiência da enxertia pode ser melhorada pela depleção seletiva de células-tronco hematopoiéticas endógenas, abrindo, assim, os nichos de células-tronco para a enxertia de células-tronco doadoras (consultar, por exemplo, o documento nº WO 2008/067115).

[00698] O transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSC), ou o transplante de medula óssea (assim chamado anteriormente), é um tratamento estabelecido para uma ampla gama de doenças que afetam as células-tronco sanguíneas do corpo, tais como leucemia, anemia grave, defeitos imunológicos e algumas doenças de deficiência de enzima. Essas doenças frequentemente levam ao paciente precisar que sua medula óssea seja substituída por novas células sanguíneas saudáveis.

[00699] O transplante de HSC é frequentemente alogênico, o que significa que o paciente recebe células-tronco de outro indivíduo da mesma espécie, ou um doador voluntário irmão, parente compatível, parente haploidêntico ou sem parentesco. Estima-se que cerca de 30% dos pacientes que precisam de transplante de célula-tronco hematopoiética têm acesso a um irmão cujo tipo de tecido é adequado. Os outros 70% dos pacientes devem depender da compatibilidade de um doador voluntário sem parentesco ou da disponibilidade de um doador parente haploidêntico. É importante que as características de cé-

lulas de doador e paciente sejam comparáveis. O transplante de célula-tronco hematopoiética poderia também ser autólogo, em que as células transplantadas são originárias do próprio sujeito, isto é, o doador e o receptor são o mesmo indivíduo. Ademais, os transplantes poderiam ser singeneicos, isto é, de um indivíduo geneticamente idêntico, tal como um gêmeo. Em um aspecto adicional, os transplantes poderiam ser xenogeneicos, isto é, originários de uma espécie diferente, o que é de interesse quando não há doadores suficientes da mesma espécie, tal como para transplantes de órgão.

[00700] Antes do transplante de HSC, os pacientes usualmente passam por um pré-tratamento ou método de condicionamento. O propósito desse pré-tratamento ou condicionamento é remover tantas células indesejadas (por exemplo, células malignas/cancerosas) no corpo quanto possível, minimizar a rejeição e/ou abrir nichos de células-tronco por depleção de HSCs endógenas para enxertia eficiente de células-tronco do doador nesses nichos. As HSCs saudáveis do doador são, então, dadas ao paciente por via intravenosa ou, em alguns casos, por via intraóssea. Muitos riscos, no entanto, estão associados ao transplante de HSC, incluindo enxertia insatisfatória, rejeição imunológica, doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD) ou infecção. Embora as células do doador e do paciente pareçam ser iguais em termos de tipo de tecido, por exemplo, as moléculas de MHC são compatíveis (ou haploidênticas); há ainda pequenas diferenças entre esses indivíduos que as células imunológicas podem perceber como perigosas. Isso significa que o novo sistema imunológico (glóbulos brancos das novas células-tronco) encara o novo corpo como "estranho", o que provoca um ataque imunológico. Essa reação, chamada de doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD), pode se tornar fatal ao paciente. Os pacientes após transplante de HSC também têm um risco aumentado de infecções devido à ausência de glóbulos brancos

antes da nova medula óssea começar a funcionar. Esse período pode, em alguns casos, durar muitos meses até o novo sistema imunológico ter amadurecido. Algumas dessas infecções oportunistas podem ser fatais.

[00701] Assim, há uma necessidade de melhorar os métodos de condicionamento e transplante e diminuir os riscos associados ao transplante de HSC e aumentar sua eficácia para vários distúrbios. São fornecidos no presente documento novos conjugados de fármaco de anticorpo que, eliminando-se especificamente as HSCs endógenas do beneficiário antes do transplante, mas não todas as outras células imunes, mantêm uma defesa imunológica parcialmente ativa para combater infecções logo após o transplante, mas, ao mesmo tempo, fornecem um efeito imunossuppressivo indireto devido à incapacidade do sujeito de formar novas células imunes a partir de suas próprias HSCs. Já que o pré-tratamento pode ser mais suave do que quimioterapia ou radiação, e com efeitos colaterais menos sérios, o mesmo pode induzir menos GVHD em pacientes de transplante.

[00702] Os conjugados de fármaco de anticorpo descritos no presente documento poderiam ser usados para ablar uma célula-tronco hematopoiética endógena, por exemplo, em um pré-tratamento/método de condicionamento antes do transplante de célula-tronco hematopoiética. Por exemplo, os conjugados da invenção poderiam ser usados para tratar qualquer afecção/distúrbio não maligno em que o transplante de células-tronco poderia ser benéfico, tal como Anemia aplástica severa (SAA), Síndrome de Wiskott Aldrich, Síndrome de Hurlers, linfo-histiocitose hemofagocítica familiar (FHL), Doença granulomatosa crônica (CGD), síndrome de Kostmanns, Síndrome de imunodeficiência severa (SCID), outros distúrbios autoimunes, tais como SLE, Esclerose múltipla, IBD, Doença de Crohn, Colite ulcerativa, síndrome de Sjogrens, vasculite, Lúpus, Miastenia Gravis, doença

de Wegener, erros congênitos de metabolismo e/ou outras imunodeficiências.

[00703] Ademais, os conjugados da invenção poderiam ser usados para tratar qualquer afecção/distúrbio maligno em que o transplante de célula-tronco poderia ser benéfico, tal como doenças hematológicas, malignidades hematológicas ou tumores sólidos (por exemplo, câncer renal, câncer hepático, câncer pancreático). Os tipos comuns de doenças/malignidades hematológicas que poderiam ser tratados com os métodos e anticorpos reivindicados são leucemias, linfomas e síndromes mielodisplásticas. Leucemia é um tipo de câncer do sangue ou medula óssea caracterizado por um aumento anormal de glóbulos brancos imaturos chamados de blastócitos, e o termo leucemia inclui: leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia monocítica aguda (AMoL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mielógena crônica (CML) e outras leucemias, tais como leucemia de célula cabeluda (HCL), leucemia pró-linfocítica de célula T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande e leucemia de célula T adulta. Em um aspecto da invenção, a leucemia tratada é leucemia aguda. Em um aspecto adicional, a leucemia é ALL, AML ou AMoL. Os linfomas incluem leucemia/linfoma de células T precursoras, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma de célula B grande difusa, linfoma de célula de manto, leucemia/linfoma linfocítica crônica de célula B, MALT linfoma, Micose fungoide, linfoma de célula T periférica não especificado de outro modo, forma de esclerose nodular do linfoma Hodgkin, subtipo de celularidade misturada do linfoma Hodgkin. Síndrome mielodisplásica (MDS) é o nome de um grupo de afecções que ocorrem quando as células formadoras de sangue na medula óssea são danificadas. Esse dano leva a baixos números de um ou mais tipos de células sanguíneas. A MDS é subdividida em 7 categorias; Citopénia refratária com displasia unilinhagem (RCUD), Anemia refratária com

sideroblastos em anel (RARS), Citopénia refratária com displasia multi-linhagem (RCMD), Anemia refratária com excesso de blastos-1 (RAEB-1), Anemia refratária com excesso de blastos-2 (RAEB-2), Síndrome mielodisplástica, não classificada (MDS-U), e Síndrome mielodisplástica associada a del isolada (5q).

[00704] Em algumas modalidades, um paciente que precisa da ablação de células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética) pode ter uma doença imunodeficiente herdada, um distúrbio autoimune, um distúrbio hematopoiético ou erros congênitos de metabolismo.

[00705] Em algumas modalidades, o distúrbio hematopoiético pode ser selecionado dentre qualquer um dentre o seguinte: Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia monocítica aguda (AMoL), leucemia mieloide crônica (CML), Leucemia linfocítica crônica (CLL), Distúrbios mieloproliferativos, síndromes Mielodisplásticas, Mieloma múltiplo, linfoma de Não-Hodgkin, doença de Hodgkin, Anemia aplástica, Aplasia de glóbulo vermelho puro, Hemoglobinúria noturna paroxismal, Anemia Fanconi, Talassemia major, Anemia de célula falciforme, Imunodeficiência combinada severa, síndrome de Wiskott-Aldrich, Linfo-histiocitose hemofagocítica.

[00706] Erros congênitos de metabolismo são também conhecidos como doenças metabólicas herdadas (IMB) ou doenças metabólicas congênitas, que são uma classe de doenças genéticas que incluem distúrbios congênitos de metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácido orgânico ou doenças de armazenamento lisossômico. Em algumas modalidades, os erros congênitos de metabolismo são selecionados dentre mucopolissacaridose, doença de Gaucher, leucodistrofias metacromáticas ou adrenoleucodistrofias.

[00707] Ademais, os conjugados da invenção poderiam ser usados

para tratar um tumor estromal gastrointestinal (GIST), tal como GIST que é positivo para cKIT. Em algumas modalidades, os conjugados da invenção poderiam ser usados para tratar GIST que expressa cKIT do tipo selvagem. Em algumas modalidades, os conjugados da invenção poderiam ser usados para tratar GIST que é resistente a um tratamento, por exemplo, imatinib (Glivec®/Gleevec®).

Terapia de Combinação

[00708] Em determinados casos, um conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com outro regime de condicionamento, tal como radioterapia ou quimioterapia.

[00709] Em determinados casos, um conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com outro agente terapêutico, tal como um agente anticâncer, agente anti-náusea (ou antiemético), analgésico, agente de mobilização ou combinações dos mesmos.

[00710] Os agentes quimioterápicos 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®), ciclosporina (Sandimmune®, Neoral® ou Restasis®), ciclofosfamida (Cytosan® 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 (Campotosar®), 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®).

[00711] Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com um bloqueador CD47, por exemplo, um anticorpo anti-CD47 ou fragmento do mesmo. Foi relatado que um microcorpo anti-CD47 que bloqueia a interação entre CD47 e a proteína reguladora de sinal alfa (SIRPα) pode intensificar a depleção de HSCs endógenas por um anticorpo anti-c-Kit nu (Chhabra *et al.*, *Science Translational Medicine* **8** (351), 351ra105).

[00712] Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com outro anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga especificamente a células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras hematopoiéticas, por exemplo, anticorpo anti-CD45 ou fragmento do mesmo, anticorpo anti-CD34 ou fragmento do mesmo, anticorpo anti-CD133 ou fragmento do mesmo, anticorpo anti-CD59 ou fragmento do mesmo ou anticorpo anti-CD90 ou fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, os conjugados de fármaco de anticorpo da presente descrição podem ser usados em combinação com um inibidor de Dyrk1a, tal como Harmina, INDY, cloridrato de ML 315, ProINDY, Tocris™ TC-S 7044, Tocris™ TG 003, FINDY, TBB, DMAT, CaNDY, etc.

[00713] Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com um ou mais supressores imunológicos, tais como glicocorticoides, por exemplo, prednisona, dexametasona e hidrocortisona; citostáticos, por exemplo, agentes alquilantes, antimetabólitos, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, etc.; fármacos que atuam nas imunofilinas, por exemplo, tacrolimus (Prograf®, Astograf XL® ou Envarsus XR®), sirolimus (rapamicina ou Rapamune®) e everolimus; interferons; opioides; proteínas de ligação a TNF; micofenolato; fingolimod; miriocina; etc. Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com um ou mais agentes que depletam especificamente células T, tais como Fludarabina, Ciclosporina, anticorpo anti-CD52, por exemplo, Alemtuzumab, Globulina antitímocítica (ATG), anticorpo anti-CD3 ou fragmento do mesmo, anticorpo anti-CD4 ou fragmento do mesmo, anticorpo anti-CD8 ou fragmento do mesmo ou anticorpo TCR α/β anti-humano ou fragmento do mesmo. As terapias de depleção de célula T podem reduzir a reação de hospedeiro versus enxerto, que poderia levar à rejeição de um transplante.

[00714] Em algumas modalidades, o conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição pode ser usado em combinação com um ou mais agentes selecionados dentre plerixafor (também conhecido como AMD3100, Mozobil®), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), por exemplo, sargramostim (Leukine®), ou fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), por exemplo, filgrastim ou pegfilgrastim (Zarzio®, Zarxio®, Neupogen®, Neulasta®, Nufil®, Religrast®, Emgrast®, Neukine®, Grafeel®, Imumax®, Filcad®).

[00715] Em um aspecto, um conjugado de anticorpo e fármaco da presente descrição é combinado em uma formulação de combinação farmacêutica, ou regime de dosagem como terapia de combinação,

com um segundo composto tendo propriedades anticâncer. O segundo composto da formulação de combinação farmacêutica ou regime de dosagem pode ter atividades complementares ao conjugado da combinação de modo que as mesmas não afetem adversamente uma à outra.

[00716] 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 em que esses intervalos de tempo permitem que os parceiros de combinação mostrem um efeito cooperativo, por exemplo, sinérgico.

[00717] O termo "terapia de combinação" refere-se à administração de dois ou mais agentes terapêuticos para tratar uma afecção ou distúrbio terapêutico descrito na presente descrição. Tal administração engloba 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 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 um dos casos, o regime de tratamento proporcionará efeitos benéficos da combinação de fármacos no tratamento das condições ou distúrbios descritos aqui.

[00718] 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 alternância ou em paralelo como formulações separadas; ou (3) por algum outro regime. Quando entregue na terapia de alternância, 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 alternância, uma dosagem eficaz de cada ingrediente ativo é administrada sequencialmente, isto é, serialmente, enquanto na terapia de combinação, dosagens eficazes de dois ou mais ingredientes ativos são administradas em conjunto.

Composições Farmacêuticas

[00719] Para preparar composições farmacêuticas ou estéreis incluindo um ou mais conjugados de fármaco de anticorpo descritos no presente documento, o conjugado (ou conjugados) fornecido(s) pode(m) ser misturado(s) com um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[00720] As formulações de agentes terapêuticos e diagnósticos podem ser preparadas misturando-se com carreadores, 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 Iorque, N.Y., 2000).

[00721] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpo da presente invenção é uma preparação de liofilisato. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpo é um liofilisato em um frasco contendo um conjugado de anticorpo, histidina, sacarose e polissorbato 20. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpo é um liofilisato em um frasco contendo um conjugado de anticorpo, succinato de sódio e polissorbato 20. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpo é um liofilisato em um frasco contendo um conjugado de anticorpo, trealose, citrato e polissorbato 8. O liofilisato pode ser reconstituído, por exemplo, com água, solução salina, para injeção. Em uma modalidade específica, a solução compreende o conjugado de anticorpo, histidina, sacarose e polissorbato 20 em um pH de cerca de 5,0. Em outra modalidade específica, a solução compreende o conjugado de anticorpo, succinato de sódio e polissorbato 20. Em outra modalidade específica, a solução compreende o conjugado de anticorpo, trealose desidratada, citrato desidratado, ácido cítrico e polissorbato 8 em um pH de cerca de 6,6. Para administração intravenosa, a solução obtida será usualmente diluída adicionalmente em uma solução carreadora.

[00722] 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 ma-

ximiza 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).

[00723] 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 previstos para afetar o tratamento. 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 inflamatórias produzidas.

[00724] 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, 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.

[00725] As composições que compreendem o conjugado de anticorpo da invenção podem ser fornecidas por infusão contínua ou por doses em intervalos de, por exemplo, um dia, um semana, ou 1 a 7 tempos 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 ou intraóssea. Um protocolo de dose específico é um que envolve a dose ou frequência de dose máxima que evita efeitos colaterais indesejáveis significativos.

[00726] Para os conjugados de anticorpo 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 0,001 mg/kg e 50 mg/kg, 0,005 mg/kg e 20 mg/kg, 0,01 mg/kg e 20 mg/kg, 0,02 mg/kg e 10 mg/kg, 0,05 e 5 mg/kg, 0,1 mg/kg e 10 mg/kg, 0,1 mg/kg e 8 mg/kg, 0,1 mg/kg e 5 mg/kg, 0,1 mg/kg e 2 mg/kg, 0,1 mg/kg e 1 mg/kg do peso corporal do paciente. A dosagem do conjugado de anticorpo pode ser calculada com o uso do peso do paciente em quilogramas (kg) multiplicado pela dose a ser administrada em mg/kg.

[00727] As doses dos conjugados de anticorpo da invenção podem ser repetidas, e as administrações podem ser separadas por menor 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, um conjugado de anticorpo da invenção é administrado 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.

[00728] 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).

[00729] 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. Mater. Res. 15:167 a 277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98 a 105, 1982; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3.688 a 3.692, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4.030 a 4.034, 1980; Patentes nº U.S. 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 nº U.S. 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 Publica-

ções 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 em sua totalidade.

[00730] Os métodos para a coadministração ou tratamento com um segundo agente terapêutico, por exemplo, uma citocina, esteroide, agente quimioterápico, antibiótico ou radiação (tal como irradiação total do corpo (TBI)), 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%.

[00731] Terapias adicionais, que podem ser administradas em combinação com os conjugados de anticorpo da invenção, podem ser administradas com menor do que 5 minutos de diferença, menor do que 30 minutos de diferença, 1 hora de diferença, em cerca de 1 hora de diferença, em cerca de 1 a cerca de 2 horas de diferença, em cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de diferença, em cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de diferença, em cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de diferença, em cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de diferença, em cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de diferença, em cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de diferença, em cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de diferença, em cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de diferença, em cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de diferença, em cerca de 11 horas a cerca de 12 horas de diferença, em 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 conjugados de anticorpo da invenção. As duas ou mais terapias podem ser administradas dentro de uma mesma consulta do paciente.

[00732] A invenção fornece protocolos para a administração da composição farmacêutica que compreende os conjugados de anticorpo da invenção sozinhos ou em combinação com outras terapias a um sujeito que precisa das mesmas. As terapias das terapias de combinação da presente invenção podem ser administradas concomitante ou sequencialmente a um sujeito. A terapia das terapias de combinação da presente invenção pode também ser ciclicamente administrada. A terapia de ciclagem envolve a administração de uma primeira terapia por um período de tempo, seguida pela administração de uma segunda terapia 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.

[00733] As terapias das terapias de combinação da invenção podem ser administradas a um sujeito concomitantemente.

[00734] O termo "concomitantemente" não se limita à administração de terapias 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 anticorpos ou conjugados de anticorpo 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; entretanto, se não for administrada ao mesmo tempo, deve ser administrada em tempo suficientemente próximo de modo a fornecer o efeito terapêutico desejado. Cada terapia pode ser administrada a um sujeito separadamente, em qualquer forma adequada e por qualquer via adequada. Em várias modalidades, as terapias são administradas a um indivíduo com menor do que 5 minutos de diferença, menor do que 15 minutos de diferença, menor do que 30 minutos de diferença, menor do que 1 hora de diferença, em cerca de 1 hora de diferença, em cerca de 1 hora a cerca de 2 horas de diferença, em cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de diferença, em cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de diferença, em cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de diferença, em cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de diferença, em cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de diferença, em cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de diferença, em cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de diferença, em cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de diferença, em cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de diferença, em 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 são administradas dentro da mesma consulta do paciente.

[00735] As terapias de combinação podem ser administradas a um sujeito na mesma composição farmacêutica. Alternativamente, os agentes terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados concomitantemente a um sujeito em composições farmacêuticas separadas. Os agentes terapêuticos podem ser administrados a um sujeito por vias de administração iguais ou diferentes.

[00736] Entende-se que os exemplos e modalidades descritos no presente documento são apenas para propósitos ilustrativos e que vá-

rias modificações ou alterações em luz dos mesmos serão sugeridas aos versados na técnica e devem ser incluídas no espírito e âmbito deste pedido e escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração de ADC anti-cKIT

Preparação de anticorpos anti-cKit e fragmentos de anticorpo com ou sem mutações de cisteína específicas para sítio

[00737] Os anticorpos anti-cKIT humanos e fragmentos de anticorpo foram gerados conforme descrito anteriormente nos documentos nºWO2014150937 e WO2016020791.

[00738] As regiões variáveis de codificação de DNA das cadeias pesada e leve de um anticorpo anti-cKit foram amplificadas de um vetor isolado em uma tela com base em apresentação em fago e clonadas em vetores de expressão de mamíferos que contêm as regiões constantes da cadeia pesada de IgG1 humana e cadeia leve capa ou cadeia leve lambda humana. Os vetores contêm um promotor de CMV e um peptídeo de sinalização (MPLLLLLLPLLWAGALA (SEQ ID NO: 151) para cadeia pesada e MSVLTQVLALLLLWLTGTRC (SEQ ID NO: 152) para cadeia leve, e sequências de sinalização e seleção apropriadas para amplificação de DNA em um hospedeiro bacteriano, por exemplo, células DH5alfa de *E. coli*, expressão temporária em células de mamíferos, por exemplo, células HEK293, ou transfecção estável em células de mamíferos, por exemplo, células CHO. Para introduzir mutações de Cys, PCR por mutagênese sítio-dirigida foi conduzida com oligos projetados para substituir resíduos de Cys únicos em determinado sítio nas regiões constantes das sequências de codificação de cadeia pesada ou cadeia leve. Os exemplos de mutações de substituição de Cys são E152C ou S375C de cadeia pesada; E165C ou S114C de cadeia leve capa; ou A143C da cadeia leve lambda (tudo numeração de EU). Em alguns casos, duas ou mais mutações de Cys

foram combinadas para produzir um anticorpo com múltiplas substituições de Cys, por exemplo, HC-E152C-S375C, lambda LC-A143C-HC-E152C, capa LC-E165C-HC-E152C ou capa LC-S114C-HC-E152C (tudo numeração de EU). Para gerar plasmídeos que codificam fragmentos de anticorpo, PCR por mutagênese foi conduzida com oligos projetados para remover ou modificar uma porção da região constante de cadeia pesada. Por exemplo, uma PCR foi realizada para remover os resíduos 222 a 447 (numeração de EU) da região constante de cadeia pesada de modo que um códon de parada tenha sido codificado diretamente após o resíduo 221 (número de EU) a fim de produzir um construto de expressão para um fragmento Fab. Por exemplo, uma PCR foi realizada para remover os resíduos 233 a 447 (numeração de EU) da região constante de cadeia pesada de modo que um códon de parada tenha sido codificado diretamente após o resíduo 232 (número de EU) a fim de produzir um construto de expressão para um fragmento Fab' incluindo os dois resíduos de Cys da dobradiça de IgG1.

[00739] Anticorpos anti-cKit, fragmentos de anticorpo e anticorpos mutantes de Cys ou fragmentos de anticorpo foram expressos em células 293 Freestyle™ cotransfectando-se plasmídeos de cadeia pesada e cadeia leve com o uso de métodos de transfecção temporários conforme descrito anteriormente (Meissner, *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 75:197-203 (2001). Os anticorpos expressos foram purificados a partir dos sobrenadantes celulares por métodos de cromatografia por afinidade padrão com o uso de uma resina apropriada, tal como resinas de Proteína A, Proteína G, Capto-L ou LambdaFabSelect. Alternativamente, anticorpos anti-cKit, fragmentos de anticorpo e anticorpos mutantes de Cys ou fragmentos de anticorpo foram expressos em uma CHO cotransfectando-se um vetor de cadeia pesada e um vetor de cadeia leve em células CHO. As células passaram por seleção, e as células estávelmente transfectadas foram, então, cultivadas sob condições otimi-

zadas para produção de anticorpos. Os anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes celulares conforme acima.

Redução, reoxidação e conjugação de anticorpos anti-cKit e fragmentos de anticorpo a toxinas

[00740] Os compostos compreendidos de uma porção química reativa, por exemplo, um grupo maleimida, para a reação a um grupo tiol (cadeia lateral de Cys) no anticorpo ou fragmento de anticorpo, um ligante conforme descrito, e uma porção química funcional, tal como uma auristatina ou outra toxina, foram conjugados a resíduos de Cys, nativos ou geneticamente modificados no anticorpo com o uso dos métodos anteriormente descritos (por exemplo, nos documentos nº WO2014124316, WO2015138615, Junutula JR, *et al.*, Nature Biotechnology 26:925 a 932 (2008)).

[00741] Devido ao fato de que os resíduos de Cys geneticamente modificados em anticorpos expressos em células de mamíferos são modificados por adutos (dissulfetos), tais como glutathione (GSH) e/ou cisteína durante a biossíntese (Chen *et al.* 2009), a Cys modificada conforme inicialmente expressa não é reativa a agentes reativos de tiol, tais como grupos maleimido ou bromo-acetamida ou iodoacetamida. Para conjugar resíduos de Cys geneticamente modificados, adutos de glutathione ou cisteína precisam ser removidos reduzindo-se dissulfetos, o que geralmente implica reduzir todos os dissulfetos no anticorpo expresso. Devido ao fato de que resíduos de Cys nativos em anticorpos e fragmentos de anticorpo formam geralmente ligações de dissulfeto a outros resíduos de Cys no anticorpo ou fragmento de anticorpo, os mesmos também não são reativos a reagentes reativos de tiol até os dissulfetos serem reduzidos. A redução de dissulfetos pode ser realizada expondo-se, primeiramente, o anticorpo a um agente redutor, tal como ditioneína (DTT), cisteína ou cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl). Opcionalmente, o agente redutor

pode ser removido para permitir a reoxidação de todas as ligações de dissulfeto nativas do anticorpo ou fragmento de anticorpo para restaurar e/ou estabilizar a estrutura de anticorpo funcional.

[00742] Em casos em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo foi conjugado apenas nos resíduos de Cys geneticamente modificados, a fim de reduzir ligações de dissulfeto nativas e a ligação de dissulfeto entre os adutos de cisteína ou GSH do(s) resíduo (ou resíduos) de Cys geneticamente modificado(s), DTT recém preparado foi adicionado a anticorpos mutantes de Cys purificados, a uma concentração final de 10 mM ou 20 mM. Após a incubação de anticorpo com DTT a 37 °C por 1 hora, as misturas foram dialisadas contra PBS por três dias com troca de tampão diária para remover DTT e reoxidar ligações de dissulfeto nativas. O processo de reoxidação foi monitorado por HPLC de fase reversa, que tem a capacidade para separar o tetrâmero de anticorpo das moléculas de cadeia leve e pesada individuais. As reações foram analisadas em uma coluna PRLP-S 4000A (50 mm x 2,1 mm, Agilent) aquecida até 80 °C e a eluição da coluna foi executada por um gradiente linear de 30 a 60% de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. A eluição das proteínas da coluna foi monitorada a 280 nm. A diálise foi deixada continuar até a reoxidação ter sido concluída. A reoxidação restaura dissulfetos intracadeia e intercadeia, enquanto a diálise permite que cisteínas e glutatonas conectadas ao(s) resíduo (ou resíduos) de Cys recém-introduzido(s) para diálise. Após a reoxidação, compostos contendo maleimida foram adicionados a anticorpos ou fragmentos de anticorpo reoxidados em tampão de PBS (pH 7,2) a razões de tipicamente 1,5:1, 2:1 ou 5:1 para Cys geneticamente modificada, e incubações foram executadas por 1 hora. Tipicamente, composto livre em excesso foi removido por purificação através de Proteína A ou outra resina apropriada por métodos-padrão seguidos por troca de tampão em

PBS.

[00743] Alternativamente, os anticorpos ou fragmentos de anticorpo com sítios de Cys geneticamente modificados foram reduzidos e reoxidados com o uso de um método em resina. Microesferas de Proteína A Sepharose (1 ml por 10 mg de anticorpo) foram equilibradas em PBS (sem sais de cálcio ou magnésio) e, então, adicionadas a uma amostra de anticorpo em modo de batelada. Um estoque de cisteína 0,5 M foi preparado dissolvendo-se 850 mg de HCl de cisteína em 10 ml de uma solução preparada adicionando-se 3,4 g de NaOH a 250 ml de fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 e, então, cisteína 20 mM foi adicionada à pasta fluida de anticorpo/microesfera e misturada gentilmente à temperatura ambiente por 30 a 60 minutos. Microesferas foram carregadas a uma coluna de gravidade e lavadas 50 volumes de leito de PBS em menor do que 30 minutos. Então, a coluna foi tampada com microesferas ressuspensas em um volume de leito de PBS. Para modular a taxa de reoxidação, cloreto de cobre 50 nM a 1 μ M foi opcionalmente adicionado. O progresso da reoxidação foi monitorado removendo-se uma pequena amostra de teste da resina, eluindo em tampão de Eluição de IgG (Thermo) e analisando por RP-HPLC conforme descrito acima. Uma vez que a reoxidação progrediu para a conclusão desejada, a conjugação poderia ser iniciada imediatamente pela adição de 2 a 3 excessos molares do composto através de cisteínas geneticamente modificadas e permitindo a mistura reagir por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente antes de a coluna ter sido lavada com pelo menos 20 volumes de coluna de PBS. Os conjugados de anticorpo foram eluídos com tampão de eluição de IgG e neutralizados com 0,1 volume de fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 e tampão trocado por PBS. Em alguns casos, em vez de iniciar a conjugação com o anticorpo na resina, a coluna foi lavada com pelo menos 20 volumes de coluna de PBS, e o anticorpo foi eluído com tampão de eluição de IgG e

neutralizado com de tampão pH 8,0. Os anticorpos foram, então, ou usados para reações de conjugação ou rapidamente congelados para uso futuro.

[00744] Em alguns casos, é desejado conjugar a resíduos de Cys nativos, tais como aqueles que usualmente formam uma ligação de dissulfeto intercadeia da cadeia pesada a cadeia leve e os resíduos de Cys em uma região de dobradiça do anticorpo que usualmente formam ligações de dissulfeto intercadeia da cadeia pesada a cadeia pesada, na ausência de resíduos de Cys geneticamente modificados ou ao mesmo tempo na medida que a conjugação foi também direcionada a resíduos de Cys geneticamente modificados. Nesses casos, o anticorpo ou fragmento de anticorpo foi reduzido adicionando-se excesso de 5 vezes de TCEP a ligações de dissulfeto e a amostra incubada a 37 °C por 1 hora. As amostras foram, então, imediatamente conjugadas ou congeladas a < -60 °C para conjugação futura. Compostos contendo maleimida foram adicionados a anticorpos ou fragmentos de anticorpo em tampão de PBS (pH 7,2) a razões de tipicamente 2:1 a resíduos de Cys usados para conjugação, e incubações foram executadas por 1 hora. Tipicamente, o composto livre em excesso foi removido dessalificando-se a coluna seguido por uma troca de tampão mais extensiva para PBS.

[00745] A conjugação a resíduos de lisina pode ser preparada reagindo-se anticorpos ou fragmentos de anticorpo com um composto de ligante-fármaco que compreende um grupo reativo amina, tal como um éster NHS ou um éster tetrafluorofenílico, (por exemplo, composto (7), SMCC-DM1, Sulfo-SPDB-DM4 ou SPDB-DM4). A título de exemplo, o Composto (7) foi conjugado a resíduos de lisina em Fab-HC-E152C anti-HER2. Especificamente, Fab-HC-E152C anti-HER2 foi expresso pela transfecção temporária em células HEK293. Fab foi capturado do meio por purificação por afinidade capto-L (GE Healthcare), eluído em

Tampão de Eluição de IgG (Pierce) e o tampão trocado por PBS por um ultraconcentrador (Amicon). À solução de Fab (5,8 mg/ml), foi adicionado excesso molar de 2 vezes do Composto (7). A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos e, então, a mistura foi bruscamente arrefecida com Tris 50 mM pH 8. O conjugado resultante foi, então, purificado por SEC preparatória em PBS.

Geração de fragmentos de anticorpo de anticorpos de comprimento total

[00746] Em alguns casos, fragmentos de anticorpo foram gerados por manipulação genética da sequência de codificação de cadeia pesada de anticorpo, conforme descrito acima, de modo que o produto da expressão tenha sido um fragmento de um anticorpo. Em outros casos, os anticorpos foram gerados pela digestão enzimática de anticorpos de comprimento total.

[00747] Para gerar os fragmentos de Fab que compreendem os resíduos 1 a 222 (numeração de EU) de um anticorpo de partida, o anticorpo completo foi tratado com resina de papaína imobilizada (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Em suma, a resina de papaína imobilizada é preparada pelo equilíbrio em um tampão de digestão de HCl de cisteína 20 mM recém dissolvido ajustado até pH 7,0. O anticorpo é ajustado a aproximadamente 10 mg/ml e teve o tampão trocado pelo tampão de digestão e adicionado à resina em um razão de 4 mg de IgG por ml de resina e incubado a 37 °C por 5 a 7 horas. A resina é, então, removida, e o fragmento de anticorpo é purificado por uma resina de afinidade apropriada, por exemplo, a IgG intata e o fragmento Fc são separados do fragmento Fab pela ligação à resina de Proteína A, ou a separação é conduzida por cromatografia de exclusão de tamanho.

[00748] Para gerar fragmentos F(ab')₂ que compreendem os resíduos 1 a 236 (numeração de EU) do anticorpo de partida, o anticorpo

completo foi tratado com uma enzima proteolítica. Em suma, o anticorpo é preparado em PBS a aproximadamente 10 mg/ml. A enzima é adicionada em uma razão de peso/peso de 1:100 e incubada por 2 horas a 37 °C. O fragmento de anticorpo é purificado por uma resina de afinidade apropriada, por exemplo, a IgG íntata e o fragmento Fc são separados do fragmento Fab' pela ligação à resina de Proteína A, ou a separação é conduzida por cromatografia de exclusão de tamanho.

Propriedades do anticorpo anti-cKit-toxina e conjugados de fragmento de anticorpo

[00749] Os conjugados de anticorpo e fragmento de anticorpo foram analisados para determinar a extensão da conjugação. Uma razão entre composto e anticorpo foi extrapolada a partir de dados de LC-MS para amostras reduzidas e deglicosiladas (quando adequado). LC/MS permite a quantificação do número médio de moléculas de carga útil de ligante (composto) fixadas a um anticorpo em uma amostra de conjugado. A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) separa o anticorpo em cadeias leve e pesada e, sob condições de redução, 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 do carregamento médio nas cadeias LC e HC, a razão média entre composto e anticorpo pode ser calculada para um conjugado de anticorpo. Uma razão entre composto e anticorpo para uma determinada amostra de conjugado representa o número médio de moléculas de composto (ligante-carga útil) fixadas a um anticorpo tetramérico contendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas.

[00750] Os conjugados foram perfilados com o uso de cromatografia de exclusão de tamanho analítica (AnSEC) em colunas Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) e/ou Proteína KW-803 5 µm 300 x 8

mm (Shodex); a agregação foi analisada com base na cromatografia de exclusão de tamanho analítica.

Preparação de conjugados de Fab anti-cKIT-toxina exemplificativos

[00751] Para gerar conjugados de Fab' anti-cKIT-toxina DAR4 ou conjugado de controle de Fab anti-Her2-toxina DAR4, 50 mg de IgG completa (tipo selvagem, sem cisteínas introduzidas) foram digeridos com uma enzima proteolítica. O fragmento F(ab')₂ foi purificado por SEC em uma coluna Superdex-S200 (GE Healthcare). Alternativamente, para gerar conjugados de controle anti-HER2 ou conjugados de Fab' anti-cKit-toxina DAR4, um vetor que codifica a HC de Fab' foi co-transfectado com um vetor que codifica a LC de Fab' em CHO. O Fab' expresso foi purificado pela captura na resina de Proteína G. O F(ab')₂ ou Fab' foi reduzido pela adição de TCEP (excesso de 5x a dissulfetos intercadeia) e reagido imediatamente com um composto da invenção (excesso de 2,5x a resíduos de Cys livres). A reação foi monitorada por RP-HPLC, e equivalentes 1x adicionais do composto foram adicionados até a reação ter sido concluída. O composto livre foi removido por coluna de dessalinização PD10 (GE Healthcare). DAR foram experimentalmente determinadas como sendo $\geq 3,9$. Os conjugados específicos adicionalmente estudados nos exemplos fornecidos são listados na Tabela 2.

[00752] Para gerar conjugados de Fab anti-cKIT-toxina DAR2, um vetor que codifica a HC de Fab com um resíduo de Cys introduzido (HC 1-221 com E152C pela numeração de EU) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab com um resíduo de Cys introduzido (capa LC K107C, capa LC S114C ou capa LC E165C pela numeração de EU) em HEK293. Para gerar conjugados de controle de Fab anti-Her2-toxina DAR2, um vetor que codifica a HC de Fab com um resíduo de Cys introduzido (HC 1-222 com E152C pela numeração de EU e

uma etiqueta His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 162)) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab com um resíduo de Cys introduzido (capa LC K107C, capa LC S114C ou capa LC E165C pela numeração de EU) em HEK293. Os Fabs expressos foram purificados por captura em resina Cpto-L (GE Healthcare) e eluição com Tampão de Eluição de IgG padrão (Thermo). Fabs tiveram o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon ultra. Fabs foram reduzidos com DTT e deixados reoxidar à temperatura ambiente. Após a reformação da ligação de dissulfeto intercadeia, os Fabs foram conjugados ao composto 6 (excesso de 3x a resíduos de Cys livres). A reação foi deixada prosseguir por 30 min à temperatura ambiente e monitorada por RP-HPLC com detecção a 310 nm. Fabs conjugados foram purificados através de resinas de proteína A (anti-her2) ou capto-L (anti-cKit) e foram lavados com PBS + 1% de Triton X-100 e lavados com PBS extensiva antes da eluição em Tampão de Eluição de IgG. Fabs tiveram, então, o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon Ultra. Os conjugados específicos adicionalmente estudados nos exemplos fornecidos são listados na Tabela 2 abaixo com valores de DAR experimentalmente determinados.

[00753] Para gerar conjugados de F(ab')₂ anti-cKIT-toxina DAR2, um vetor que codifica a HC com resíduos de Cys introduzidos (E152C e S375C pela numeração de EU) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab em CHO. Para gerar conjugados de controle de F(ab')₂ anti-Her2-toxina DAR2, um vetor que codifica a HC com resíduos de Cys introduzidos (E152C e S375C pela numeração de EU) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab em HEK293. As IgGs expressas foram purificadas por captura em resina de proteína A ou mabselectsure (GE Healthcare) e eluição com Tampão de Eluição de IgG padrão (Thermo). IgGs completas foram reduzidas com DTT à temperatura ambiente e reoxidadas após a remoção de DTT

conforme monitorado por RP-HPLC. As IgGs reoxidadas foram, então, digeridas com uma enzima proteolítica para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Para fragmentos anti-cKIT, $F(ab')_2$'s tiveram o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon ultra. Para fragmento anti-HER2, a fração de $F(ab')_2$ foi enriquecida por HIC preparatória e, então, o tampão foi trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon ultra. Os $F(ab')_2$'s foram conjugados ao composto 4 ou composto 5 (excesso de 4x a resíduos de Cys livres). A reação foi deixada prosseguir por 30 min à temperatura ambiente e monitorada por RP-HPLC com detecção a 310 nm. Os $F(ab')_2$'s conjugados foram purificados através de resinas capto-L (Ab3 anti-cKit) e foram lavados com PBS + 1% de Triton X-100 e lavados com PBS extensiva antes da eluição em Tampão de Eluição de IgG ou por SEC preparatória (Ab4 anti-her2 e anti-cKIT). $F(ab')_2$'s foram, então, concentrados e tiveram o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon Ultra. Os conjugados específicos adicionalmente estudados nos exemplos fornecidos são listados na Tabela 2 abaixo com valores de DAR experimentalmente determinados.

[00754] Para gerar conjugados de Fab anti-cKIT-toxina DAR1, um vetor que codifica a HC com resíduos de Cys introduzidos (E152C pela numeração de EU) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab em HEK293. A IgG expressa foi purificada por captura em resina de proteína A (GE Healthcare) e eluição com Tampão de Eluição de IgG padrão (Thermo). IgGs completas foram reduzidas com DTT à temperatura ambiente e reoxidadas após a remoção de DTT conforme monitorado por RP-HPLC. IgG foi digerida com papaína imobilizada (Thermo) para gerar o fragmento Fab. Fabs tiveram o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon ultra. Os Fabs foram conjugados ao Composto 4 (excesso de 4x a resíduos de Cys livres). A reação foi deixada prosseguir por 30 min à temperatura ambiente e

monitorada por RP-HPLC com detecção a 310 nm. O Fab conjugado foi purificado por SEC preparatória em PBS.

[00755] Para gerar conjugados de controle de Fab anti-Her2-toxina DAR1, um vetor que codifica a HC de Fab com resíduos de Cys introduzidos (E152C pela numeração de EU) foi cotransfectado com um vetor que codifica a LC de Fab em HEK293. Os Fabs expressos foram purificados por captura em resina Capto-L (GE Healthcare) e eluição com Tampão de Eluição de IgG padrão (Thermo). Fabs tiveram o tampão trocado por PBS com o uso de dispositivos Amicon ultra. O Fab foi conjugado ao Composto 7 (excesso molar de 2x a Fab). A reação foi deixada prosseguir por 30 min à temperatura ambiente e monitorada por RP-HPLC com detecção a 310 nm. A conjugação foi bruscamente arrefecida com Tris 50 mM pH 8,0. O Fab conjugado foi purificado por SEC preparatória em PBS.

Tabela 2. Conjugados anti-cKIT ou de controle exemplificativos

Conjugado Nº	Fragmen- to de anticorpo	Método de Con- jugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmen- to de anticorpo	Carga útil	DAR
J1	Fab'1 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa*	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Composto (1)	4
J2	Fab'2 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Composto (1)	4
J3	Fab'3 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 25	Composto (1)	4
J4	Fab'4 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 84	Composto (1)	4
J5	Fab'5 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 110	Composto (1)	4
J6	Fab' Anti-Her2	Conjugação de Cisteína Nativa	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFY AMDYWGGQGLVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA	DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQDVNTAV AWYQQKPGKA PKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSR SGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQ QHYTTPPTFGQ GTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQ	Composto (1)	4

Conju- gado Nº	Fragmen- to de an- ticorpo	Método de Con- jugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmen- to de anticorpo	Carga útil	DAR
			ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLG (SEQ ID NO: 146)	LKSGTASVVCL LNNFYPPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTL TLKADYEKHK VYACEVTHQGL SSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO: 147)		
J7	Fab3 Anti- cKIT	Cisteínas Gene- ticamente Modi- ficadas em HC- E152C e LC- E165C (EU)	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 134	Composto (6)	1,7
J8	Fab Anti- Her2	Cisteínas Gene- ticamente Modi- ficadas em HC- E152C e LC- K107C (EU)	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKHHHHHH (SEQ ID NO: 148)	DIQMTQSPSSSL SASVGDRVTIT CRASQDVNTAV AWYQQKPGKA PKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSR SGTDFTLTISL QPEDFATYYCQ QHYYTPPTFGQ GTKVEICRTVAA PSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCL LNNFYPPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTL TLKADYEKHK VYACEVTHQGL SSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO: 149)	Composto (6)	1,8
J9	F(ab'4) ₂ Anti-cKIT	Cisteínas Gene- ticamente Modi- ficadas em HC- E152C (EU)	QVQLQQSGPGLVK PSQTLSTCAISGD SVSTNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRI YYRSQWLNDYAVS VKSRLTINPDTSKN QFSLQLNSVTPED	SEQ ID NO: 84	Composto (4)	1,9

Conju- gado Nº	Fragmen- to de an- ticorpo	Método de Con- jugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmen- to de anticorpo	Carga útil	DAR
			TAVYYCARQLTYP YTVYHKALDVWGQ GTLVTVSSastkgps vfplapsskstsggtaalg clvkdyfpCpvtvswng altsgvhtfpavlgssglysl ssvvtvpssslgtqtyicnv nhkpsntkvdkrvepksc dkthtcppcpapellg (SEQ ID NO: 153)			
J10	F(ab'3) ₂ Anti-cKIT	Cisteínas Gene- ticamente Modi- ficadas em HC- E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCASG GTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGTIG PFEGQPRYAQKFQ GRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARGGYISDF DVWGQGTLVTVSS astkgpsvfplapssksts ggtaalgclvkdyfpCpvt vswngaltsgvhtfpavl qssglyslssvvtvpsssl gtqtyicnvnhkpsntkvdk rvepkscdkthtcppcp apellg (SEQ ID NO: 154)	SEQ ID NO: 25	Composto 2 (5)	
J11	Fab3 Anti- cKIT	Cisteínas Gene- ticamente Modi- ficadas em HC- E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCASG GTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGTIG PFEGQPRYAQKFQ GRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARGGYISDF DVWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALG CLVKDYFPcPVTVS WNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKT H (SEQ ID NO: 155)	SEQ ID NO: 25	Composto (4)	0,9

Conjugado Nº	Fragmento de anticorpo	Método de Conjugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmento de anticorpo	Carga útil	DAR
J12	F(ab') ₂ Anti-Her2	Cisteínas Geneticamente Modificadas em HC-E152C (EU)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTTLVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLG (SEQ ID NO: 156)	SEQ ID NO: 147	Composto (4)	1,7
J13	Fab Anti-Her2	Cisteínas Geneticamente Modificadas em HC-E152C (EU)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTTLVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDK (SEQ ID NO: 157)	SEQ ID NO: 147	Composto (7)	0,9
J14	Fab'1 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	4
J15	Fab'1 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Composto (5)	4
J16	Fab'1 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Composto (2)	4

Conjugado Nº	Fragmen- to de an- ticorpo	Método de Con- jugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmen- to de anticorpo	Carga útil	DAR
J17	Fab'2 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	mc-MMAF	4
J18	Fab'2 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Composto (5)	4
J19	Fab'2 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Composto (2)	4
J20	Fab'3 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	4
J21	Fab'3 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 25	Composto (5)	4
J22	Fab'3 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	Composto (2)	4
	Fab4 Anti- cKIT	HC-E152C (EU)	QVQLQQSGPGLVK PSQTLSLTCAISGD SVSTNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGR YYRSQWLNDYAVS VKSRLTINPDTSKN QFSLQLNSVTPED TAVYYCARQLTYP YTVYHKALDVWGQ GTLVTVSSastkgps vfplapsskstsggtaalg clvkdyfpCpvtvswng altsgvhtfpavlgssglysl ssvvtvpssslgtqtyicnv nhkpsntkvdkrvepksc dk (SEQ ID NO: 158)	SEQ ID NO: 84	nenhuma	
	Fab1 Anti- cKIT	HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCASG GTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGVIF PAEGAPGYAQKFQ GRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARGGYISDF DVWGQGTLVTVSS astkgpsvfplapsskst ggtaalgclvkdyfpCpvt vswngaltsgvhtfpavl qssglyslssvvtvpsssl gtqtyicnvnhkpsntkv krvepkscdk (SEQ ID NO: 159)	SEQ ID NO: 25	nenhuma	

Conjugado Nº	Fragmen- to de an- ticorpo	Método de Con- jugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmen- to de anticorpo	Carga útil	DAR
	Fab2 Anti- cKIT	HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASG GTFSSHALSWVRQ APGQGLEWMGGII PSFGTADYAQKFQ GRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARGLYDFDY WGQGTTLVTVSSast kgpsvfplapsskstsggt aalgclvkdyfpCpvtvs wnsгалtsgvhtfpavlqs sglyslssvvtvpssslgtq tyicnvnhkpsntkvdkrv epkscdk (SEQ ID NO: 160)	SEQ ID NO: 49	nenhuma	
	Fab3 Anti- cKIT	HC-E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASG GTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGTIG PFEGQPRYAQKFQ GRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYYCARGGYISDF DVWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALG CLVKDYFPCPTV SWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCD K (SEQ ID NO: 161)	SEQ ID NO: 25	nenhuma	
	Fab Anti- Her2	HC-E152C (EU)	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 147	nenhuma	
	Fab'5 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	Composto (1)	3,9
	Fab'5 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	Composto (1)	3,7
	Fab'5 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	mc-MMAF	4
JW	Fab'2 Anti- cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 49	Composto (1)	3,9
JX	Fab'2 Anti-	Conjugação de	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 49	mc-MMAF	3,9

Conjugado Nº	Fragmento de anticorpo	Método de Conjugação	Sequência de HC de fragmento de anticorpo	Sequência de LC de fragmento de anticorpo	Carga útil	DAR
	cKIT	Cisteína Nativa				
JY	Fab'3 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	Composto (1)	3,9
JZ	Fab'3 Anti-cKIT	Conjugação de Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	3,9

* Conjugação de Cys nativa significa que o fármaco é fixado ao fragmento de anticorpo em um ou mais dos resíduos de cisteína nativos selecionados dentre LC-214C e HC-220C-226C-229C (todas as posições pela numeração de EU).

Exemplo 2: Geração de proteínas extracelulares de domínio cKIT de ser humano, cino, camundongo e rato e de subdomínios de cKIT 1 a 3 e 4 a 5 para ensaios de ligação

[00756] Os domínios extracelulares de cKIT de ser humano, camundongo e rato (ECD) tiveram o gene sintetizado com base em sequências de aminoácido dos bancos de dados GenBank ou Uniprot (consultar a Tabela 3 abaixo). Os modelos de cDNA de ECD 1 e cKIT de cinomolgos tiveram o gene sintetizado com base em informações de sequências de aminoácidos geradas com o uso de mRNA de vários tecidos de cino (por exemplo, Zyagen Laboratories; Tabela 4 abaixo). Todos os fragmentos de DNA sintetizados foram clonados em vetores de expressão apropriados, por exemplo, vetor baseado em hEF1-HTLV (pFUSE-mIgG2A-Fc2) com etiquetas C-terminais para permitir a purificação.

Tabela 3 Sequências de construtos de cKIT de ser humano, camundongo, rato

Nome	Descrição	Número de Acesso	SEQ ID NO:
D1-5 de cKIT humano (domínio extracelular)	<u>cKIT humano tr. variante 2, resíduos 26-520-TAG</u> QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGD EIRLLCTDPGFVKWTFEILDETENENKQ NEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSN SIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDT LVRCLTDPEVTNYSKGCQGKPLPK DLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHC SVDQEGKSVLSEKFIKVRPAFAKAVPV VSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSS SVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHG DFNYERQATLTISSARVNDSGVFCY ANNTFGSANVTTTLEVVDKGFIFPMI NTTVFVNDGENVDLIVEYEAFFKPEHQ QWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESENIR YVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDV NAAIAFNYYVNTKPEILTYDRLVNGML QCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSA SVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSID SSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFN FAFKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH	NM_001093772	112
D1-3 de cKIT humano	<u>cKIT humano tr. Variante 1, resíduos 26-311-TAG</u> QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGD EIRLLCTDPGFVKWTFEILDETENENKQ NEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSN SIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDT LVRCLTDPEVTNYSKGCQGKPLPK DLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHC SVDQEGKSVLSEKFIKVRPAFAKAVPV VSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSS SVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHG DFNYERQATLTISSARVNDSGVFCY ANNTFGSANVTTTLEVVDKGRSHHHH HH	NM_000222	113

Nome	Descrição	Número de Acesso	SEQ ID NO:
D4-5 de cKIT humano	<u>cKIT humano tr. variante 1, resíduos 311-524-TAG</u> GFNIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYE AFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPK SENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYT FLVNSSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTYD RLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPG TEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGK LVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDV GKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTP RSHHHHHH	NM_000222	114
D1-5 de cKIT de camundongo	<u>cKIT de camundongo tr. variante 1, resíduos 26-527-TAG</u> SQPSASPGESPSPSIHPAQSELIVEAG DTLSLTCIDPDFVRWTFKTYFNEMVEN KKNEWIQEKAEATRTGTYTCSNSNGL TSSIYVFVRDPAKLFLVGLPLFGKEDS DALVRCPLTDPQVSNYSLIECDGKSLP TDLTFVPNPKAGITIKNVKRAYHRLCV RCAAQRDGTWLHSDKFTLKVRAAIKAI PVVSPETSHLLKKGDTFTVVCTIKDV STSVNSMWLKMNPQPQHIAQVKHNS WHRGDFNYERQETLTISSARVDDSGV FMCYANNTFGSANVTTLKVVEKGFIN ISPVKNNTTVFVTDGENVDLVVEYEAYP KPEHQQWIYMNRTSANKGKDYVKSD NKSNIYVNQLRLTRLKGTEGGTYTFL VSNSDASASVTFNVYVNTKPEILTYDR LINGMLQCVAEGFPEPTIDWYFCTGAE QRCTTPVSPVDVQVQNVSVSPFGKLV VQSSIDSSVFRHNGTVECKASNDVGK SSAFFNFAFKEQIQAHFTLFTPLEVLFQ GPRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNKDLPAPIERTISKPGSVRA PQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	NM_001122733	115

Nome	Descrição	Número de Acesso	SEQ ID NO:
D1-5 de cKIT de rato	<u>cKIT de rato, resíduos 25-526-TAG</u> SQPSASPGEPSPPSIQPAQSELIVEAG DTIRLTCTDPAFVKWTFEILDVRIENKQ SEWIREKAEATHTGKYTCVSGSGLRS SIYVFVRDPAVLFLVGLPLFGKEDNDA LVRCPPLTDPQVSNYSLIECDGKSLPTD LKFPVNPAGITIKNVKRAYHRLCIRCA AQREGKWMRSDKFTLKVRAAIAIPVV SVPETSHLLKEGDTFTVICTIKDVSTSV DSMWIKLNPQPQSKAQVKRNSWHQG DFNYERQETLTISSARVNDSGVFCY ANNTFGSANVTTLKVVEKGFIFPVK NTTVFVTDGENVDLVVEFEAYPKPEH QQWIYMNRTPTNRGEDYVKSDNQSN RYVNELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSD VSASVTFDVYVNTKPEILTYDRLMNGR LQCVAAAGFPEPTIDWYFCTGAEQRCT VPVPPVDVQIQNASVSPFGKLVVQSSI DSSVFRHNGTVECKASNAVGKSSAFF NFAFKGNSKEQIQPHTLFTPRSLEVL QGGSPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMLSLSPMVTCTVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKC KVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQV YVLPPEAEEMTKKEFSLTTCMITGFLPA EIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSD GSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSV VHEGLHNHLTTKTISRSLGK	NM_022264	116

Tabela 4 Sequências de proteína de cKIT de cinomolgos

Construto	Sequência de aminoácidos em código de uma letra, peptídeo de sinalização sublinhado cKIT de macacos cinomolgos, resíduos 25-520-TAG	SEQ ID NO
D1-5 de cKIT de macacos cinomolgos	<u>MYRMQLLSCIALSLALVTNSQPSVSPGEPS</u> PPSIHPAKSELIVRVGNEIRLLCIDPGFVKW TFEILDETNEKQNEWITEKAEATNTGKYT CTNKHGLSSSIYVFVRDPAKFLVDRSLYG KEDNDTLVRCPLTDPEVTSYSLKGCQGKP LPKDLRFVPDPKAGITIKSVKRAYHRLCLHC SADQEGKSVLSDKFILKVRPAFKAVPVVSV SKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTW KRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQAT LTISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTT LEVVDKGFIFPMINTTVFVNDGENVDLIV EYEAFFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPK SENE SNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLV SNSDVNASIAFN VYVNTKPEILTYDRLVNG MLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSAS VLPVDVQTLNASGPPFGKLVVQSSIDSSAF KHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNN KEQIHPHTLFTPRSHHHHHH	117

Expressão de Proteínas de ECD de cKIT Recombinantes

[00757] As proteínas recombinantes de cKIT desejadas foram expressas em linhagens celulares derivadas de HEK293 (293FS) anteriormente adaptadas à cultura de suspensão e cultivadas em meio sem soro FreeStyle-293 (Gibco, nº de catálogo 12338018). A produção de proteína em pequena escala e em grande escala foi por meio da transfecção temporária e foi realizada em múltiplos frascos agitadores (Nalgene), até 1 l cada, com 293Fectin® (Life Technologies, nº de catálogo 12347019) como um carreador de plasmídeo. DNA total e 293Fectin foram usados em uma razão de 1:1,5 (em p:v). A razão entre DNA e cultura foi 1 mg/l. Os sobrenadantes de cultura de células foram cole-

tados 3 a 4 dias após a transfecção, centrifugados e esterilizados por filtração antes da purificação.

Purificação de Proteína de ECD Etiquetada

[00758] As proteínas de domínio extracelular de cKIT etiquetadas com Fc recombinantes (por exemplo, ECD-Fc de cKIT humano, cKIT humano (subdomínios de ECD 1-3, 4-5)-Fc, cKIT-mFc de cino, cKIT-mFc de rato, cKIT-mFc de camundongo) foram purificadas a partir do sobrenadante de cultura celular. O sobrenadante clarificado foi passado através de uma coluna de Proteína A Sepharose® que tinha sido equilibrada com PBS. Após a lavagem até a linha de base, o material ligado foi eluído com Tampão de Eluição de baixo pH Pierce Immuno-pure® ou glicina 100 mM (pH 2,7) e imediatamente neutralizado com 1/8 do volume de eluição de Tris 1 M pH 9,0. A proteína agrupada foi concentrada se necessário com o uso de concentradores centrífugos de 15 ml Amicon® Ultra com cortes de peso molecular nominais de 10 kD ou 30 kD. Os grupamentos foram então purificados por SEC com o uso de uma coluna Superdex® 200 26/60 para remover agregados. A proteína purificada foi, então, caracterizada por SDS-PAGE e SEC-MALLS (dispersão de luz laser em múltiplos ângulos). A concentração foi determinada por absorvância a 280 nm, com o uso dos coeficientes de absorção teóricos calculados a partir da sequência pelo Vetor NTI.

Exemplo 3: Ligação de Fabs de cKIT a subdomínios de ECD de cKIT

[00759] Para ajudar a definir os sítios de ligação dos Abs de cKIT, o ECD de cKIT humano foi dividido em subdomínios 1-3 (domínio de ligação a ligante) e subdomínios 4-5 (domínio de dimerização). Para determinar quais subdomínios foram ligados, um ensaio ELISA de sanduíche foi empregado. 1 µg/ml de ECD diluído em solução salina tamponada com fosfato 1X correspondendo aos subdomínios de cKIT 1-3, subdomínios 4-5 ou ECD de cKIT de comprimento total foi reves-

tido em placas Immulon® 4-HBX com 96 poços (Thermo Scientific nº de catálogo 3855, Rockford, IL) e incubado de um dia para o outro a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS) com 0,01% de Tween-20 (Bio-Rad 101-0781)). As placas foram bloqueadas com 280 µl/poço de Albumina Sérica Bovina 3% diluídos em 1XPBS por 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Os anticorpos foram preparados em 2 µg/ml em tampão de lavagem com diluições de 5 vezes para 8 pontos e adicionados a placas de ELISA a 100 µl/poço em triplicata. As placas foram incubadas em um agitador orbital com agitação a 200 rpm por 1 h à temperatura ambiente. As placas de ensaio foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. O anticorpo secundário IgG anti-humana de Cabra de Fragmento F(ab')₂ (H+L) (Jackson ImmunoResearch nº de catálogo 109-036-088, West Grove, PA) foi preparado a 1:10.000 em tampão de lavagem e adicionado a placas de ELISA a 100 µl/poço. As placas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 h à temperatura ambiente com agitação a 200 rpm em um agitador orbital. As placas de ensaio foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Para desenvolver o sinal de ELISA, 100 µl/poço de substrato de TMB Sure blue ® (KPL nº de catálogo 52-00-03, Gaithersburg, MD) foram adicionados às placas e deixados incubar por 10 min à temperatura ambiente. Para parar a reação, 50 µl de Ácido Clorídrico 1 N foram adicionados a cada poço. A absorbância foi medida a 450 nm com o uso de um leitor de placas Molecular Devices SpectraMax® M5. Para determinar a resposta de ligação de cada anticorpo, as medições de densidade óptica foram promediadas, os valores de desvio padrão gerados e colocados em gráfico com o uso de Excel. As características de ligação do anticorpo anti-cKIT individual para cKIT podem ser encontradas na Tabela 5.

Exemplo 4: Medições de afinidade de anticorpos de cKIT

[00760] A afinidade dos anticorpos a ortólogos de espécie de cKIT e também a cKIT humano foi determinada com o uso de tecnologia SPR que usa um instrumento Biacore® 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) e com chips de sensor CM5.

[00761] Em suma, HBS-P (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,005% de Tensoativo P20) suplementado com 2% de tampão bloqueador Odyssey® (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) foi usado como o tampão de execução para todos os experimentos. O nível de imobilização e as interações de analito foram medidos por unidade de resposta (RU). Experimentos piloto foram realizados para testar e confirmar a viabilidade da imobilização do anticorpo Fc anti-humano (número de catálogo BR100839, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) e a captura dos anticorpos de teste.

[00762] Para medições cinéticas, os experimentos foram realizados em que os anticorpos foram capturados à superfície de chip de sensor por meio do anticorpo Fc anti-humano imobilizado e a capacidade das proteínas de cKIT para se ligar em solução livre foi determinada. Em suma, 25 µg/ml do anticorpo Fc anti-humano a pH 5 foram imobilizados em um chip de sensor CM5 através de acoplamento de amina a uma taxa de fluxo de 5 µl/min em ambas as células de fluxo para atingir 10.500 RUs. 0,1 a 1 µg/ml dos anticorpos de teste foi, então, injetado a 10 µl/min por 1 minuto. Os níveis capturados dos anticorpos foram geralmente mantidos abaixo de 200 RUs. Subsequentemente, 3,125 a 50 nM de domínios extracelulares de receptor de cKIT (ECD) foram diluídos em uma série de 2 vezes e injetados em uma taxa de fluxo de 40 µl/min por 3 min através das células de fluxo de teste e de referência. Uma tabela de ECDs testados é listada abaixo (Tabela 5). A dissociação da ligação de ECD foi seguida por 10 min. Após cada ciclo de injeção, a superfície de chip foi regenerada com MgCl₂ 3 M a 10 µl/min por 30 segundos. Todos os experimentos foram realizados a

25 °C e os dados de resposta foram globalmente ajustados com um simples modelo de interação de 1:1 (com o uso do software Scrubber 2 ® versão 2.0b (BioLogic Software) para obter estimativas da taxa de associação (k_a), taxa de dissociação (k_d) e afinidade (K_D). A Tabela 6 lista a ligação e afinidade de domínio dos anticorpos anti-cKIT selecionados.

Tabela 5 Fonte e isotipo de ECD de cKIT

Isotipo de ECD	Etiqueta	Fonte
Ser humano	6x His C-terminal (SEQ ID NO: 162)	Construto Novartis
Cino	6x His C-terminal (SEQ ID NO: 162)	Construto Novartis
Camundongo	6x His C-terminal (SEQ ID NO: 162)	Sino Biological Inc (número de catálogo: 50530-M08H)
Rato	mFc C-terminal	Construto Novartis

Tabela 6 Reatividade cruzada e afinidade de anticorpo

Ab	Ligação de domínio de cKIT	KD (pM) para ECD de cKIT humano em SET	KD (pM) para ECD de cKIT de cino em SET	Reatividade para cKIT de camundongo	Reatividade para cKIT de rato
Ab1 Anti-cKIT	D1-3	94	170	Não reativo	Não reativo
Ab2 Anti-cKIT	D1-3	7	10	Não reativo	Não reativo
Ab3 Anti-cKIT	D1-3	160	52	Não reativo	Não reativo
Ab4 Anti-cKIT	D4-5	2400	140	Sim	Sim
Ab5 Anti-cKIT	D1-3	110	180	Sim	Sim

Exemplo 5 Ensaios de eliminação de células de HSC de ser humano e camundongo in vitro por ADCs de cKIT

Ensaios de viabilidade de HSC in vitro

[00763] Células-tronco hematopoiéticas (HSCs) de sangue periférico mobilizadas humanas foram obtidas a partir de HemaCare (número de catálogo M001F-GCSF-3). Cada frasco de ~1 milhão de células foi descongelado e diluído em 10 ml de 1X HBSS e centrifugado por 7 minutos a 1.200 rpm. O pélete celular foi ressuspensão em 18 ml de meio de crescimento contendo três fatores de crescimento (StemSpan SFEM (StemCell Technologies, número de catálogo 09650) com 50 ng/ml, cada um, de TPO (R&D Systems, número de catálogo 288-TP), ligante Flt3 (Life Technologies, número de catálogo PHC9413) e IL-6 (Life Technologies, número de catálogo PHC0063), suplementados com aminoácidos (Gibco, número de catálogo 10378-016)).

[00764] As células da medula óssea de camundongos C57BL/6J foram coletadas dos fêmures e tíbias, ressuspensas em IMDM (HyClone, número de catálogo SH30228.01) e agrupadas. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 300 g. O pélete celular foi ressuspensão no tampão AutoMACS (1X PBS + BSA 0,5% + EDTA 2 mM) em uma concentração de 100 milhões de células em 40 µl. O coquetel de anticorpo de linhagem (Miltenyi, número de catálogo 130-090-858) foi adicionado a uma concentração de 10 µl por 100 milhões de células. As células foram incubadas por 10 minutos na câmara fria antes da adição de 30 µl de tampão AutoMACS e 20 µl de microesferas magnéticas biotiniladas por 100 milhões de células. Essa nova suspensão foi incubada na câmara fria por 15 minutos. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 300 g. O pélete foi ressuspensão em 2 ml do tampão AutoMACS e passado através de um filtro celular. As células foram selecionadas no AutoMACS com o uso do protocolo de "depleção". A fração negativa da seleção foi centrifugada por 10 minutos a

300 g e ressuspensa em 1 ml de HBSS. As células ressuspensas foram manchadas com anti-CD45-PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson, número de catálogo 550994), anti-CD48-FITC (eBioscience, número de catálogo 11-0481-82), anti-CD150-PE (BioLegend, número de catálogo 115904) e anti-Sca-1 (Becton Dickinson, número de catálogo 560653). As células foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 300 g e ressuspensas em 700 µl de tampão FACS para seleção. As células Sca-1⁺ foram positivamente selecionadas em uma FACS Aria. Após a seleção, as células foram colocadas em meio de crescimento contendo três fatores de crescimento (StemSpan SFEM com 50 ng/ml de TPO (R&D Systems, número de catálogo 288-TP), ligante Flt3 (Life Technologies, número de catálogo PHC9413) e IL-6 (Life Technologies, número de catálogo PHC0063) suplementadas com aminoácidos (Gibco, número de catálogo 10378-016)).

[00765] Os agentes de teste foram diluídos em duplicata em uma placa de ensaio preta com 384 poços em um volume final de 5 µl, iniciando a 10 µg/ml e com diluições seriais de 1:3. As células do anterior foram adicionadas a cada poço em um volume final de 45 µl. As células foram incubadas a 37 °C e 5% de oxigênio por 7 dias. No final da cultura, as células foram coletadas para manchamento centrifugando-se a placa de ensaio por 4 minutos a 1.200 rpm. Os sobrenadantes foram, então, aspirados e as células foram lavadas e transferidas para uma placa de 384 poços diferente (tratada com TC Greiner Bio-One, plana transparente preta, número de catálogo 781092).

[00766] Para ensaios de células humanas, cada poço foi manchado com anti-CD34-PerCP (Becton Dickinson, número de catálogo 340666) e anti-CD90-APC (Becton Dickinson, número de catálogo 559869), lavado e ressuspenso em tampão FACS a um volume final de 50 µl. Para ensaios de células de camundongo, cada poço foi man-

chado com anti-CD45-PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson, número de catálogo 550994), anti-CD48-FITC (eBioscience, número de catálogo 11-0481-82), anti-CD150-PE (BioLegend, número de catálogo 115904), anti-cKIT-APC (Becton Dickinson, número de catálogo 553356) e anti-Sca-1 (Becton Dickinson, número de catálogo 560653), lavado e ressuspenso em tampão FACS a um volume final de 50 µl. As células foram então analisadas em um citômetro de fluxo Becton Dickinson Fortessa e quantificadas para análise.

[00767] Conjugados de toxina de anticorpos e fragmentos de anticorpo que reconhecem cKIT eliminaram HSCs conforme determinado nesse ensaio. A quantificação das células por FACS mostrou menos células viáveis em poços tratados com conjugados de anti-cKIT-toxina do que em poços de controle tratados com PBS ou com conjugados de toxina de controle de isotipo de anticorpo ou fragmento de anticorpo. Os dados são mostrados na Figura 1, Figura 2 e Figura 9 e resumidos na Tabela 7. A convenção de nomenclatura usada no presente documento é J#, corresponde ao nº de Conjugado específico descrito na Tabela 2.

Tabela 7. Viabilidade celular após o tratamento de conjugados de Fab anti-cKIT-toxina

Conjugado testado	População de células	EC50 (ng/ml)
J3	Células nucleadas totais humanas	45
	Células CD34+ humanas	8
	Células CD90+ humanas	12
J2	Células nucleadas totais humanas	58
	Células CD34+ humanas	11
	Células CD90+ humanas	16
J1	Células nucleadas totais humanas	48
	Células CD34+ humanas	11
	Células CD90+ humanas	13

Conjugado testado	População de células	EC50 (ng/ml)
J4	Células nucleadas totais de camundongo	3800
	Células CD45+ de camundongo	3800
	Células cKIT+ de camundongo	8
J5	Células nucleadas totais de camundongo	210
	Células CD45+ de camundongo	210
	Células cKIT+ de camundongo	120
J14	Células nucleadas totais humanas	7
	Células CD34+ humanas	10
	Células CD90+ humanas	11
J15	Células nucleadas totais humanas	6
	Células CD34+ humanas	5
	Células CD90+ humanas	1
J16	Células nucleadas totais humanas	6
	Células CD34+ humanas	7
	Células CD90+ humanas	9
J17	Células nucleadas totais humanas	12
	Células CD34+ humanas	16
	Células CD90+ humanas	37
J18	Células nucleadas totais humanas	15
	Células CD34+ humanas	11
	Células CD90+ humanas	3
J19	Células nucleadas totais humanas	14
	Células CD34+ humanas	16
	Células CD90+ humanas	23
J20	Células nucleadas totais humanas	20
	Células CD34+ humanas	25
	Células CD90+ humanas	72
J21	Células nucleadas totais humanas	154
	Células CD34+ humanas	88
	Células CD90+ humanas	22
J22	Células nucleadas totais humanas	8

Conjugado testado	População de células	EC50 (ng/ml)
	Células CD34+ humanas	10
	Células CD90+ humanas	17

Exemplo 6 Ensaio in vitro de degranulação de mastócito humano

[00768] Mastócitos maduros foram gerados com o uso de progenitores CD34+ a partir do sangue periférico mobilizado. As células CD34+ foram cultivadas em StemSpan SFEM (StemCell Technologies) suplementado com fator de célula-tronco humano recombinante (rhSCF, 50 ng/ml, Gibco), interleucina humana recombinante 6 (rhIL-6, 50 ng/ml, Gibco), IL-3 humana recombinante (30 ng/ml, Peprotech), GlutaMAX (2 nM, Gibco), penicilina (100 U/ml, Hyclone) e estreptomicina (100 µg/ml, Hyclone). hIL-3 recombinante foi adicionada apenas durante a primeira semana da cultura. Após a terceira semana, metade do meio foi substituída semanalmente por meio fresco contendo rhIL-6 (50 ng/ml) e rhSCF (50 ng/ml). A pureza de mastócito maduro foi avaliada por mancha de superfície do receptor de IgE de alta afinidade (FCεRI, eBioscience) e CD117 (BD). As células foram usadas entre as semanas 8 e 12 da cultura.

[00769] Os mastócitos derivados foram lavados uma vez para remover SCF, e a quantidade exigida de células foi incubada de um dia para o outro em meio de mastócitos contendo rhIL-6 (50 ng/ml) com ou sem rhSCF (50 ng/ml). Como controle positivo para a degranulação de mastócito, uma porção das células foi sensibilizada com IgE de mieloma humano (100 ng/ml, EMD Millipore). No dia seguinte, diluições de anticorpo anti-cKIT ou fragmentos de anticorpo ou conjugados de toxina do mesmo, IgG1 anti-humana monoclonal de camundongo (específica para Fab, Sigma), IgE anti-humana de cabra (Abcam) e composto 48/80 (Sigma) foram preparadas em tampão de degranulação de HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato de sódio dibásico 0,4 mM, glicose 5,6 mM, pH ajustado a 7,4 e misturadas com

cloreto de cálcio 1,8 mM e sulfato de magnésio 1,3 mM) suplementado com albumina sérica bovina 0,04% (BSA, Sigma). Agentes de teste e anti-IgG1 foram misturados em conjunto em uma placa de ensaio de 384 poços de fundo em V enquanto anti-IgE e o composto 48/80 foram testados sozinhos. A placa de ensaio foi incubada 30 min a 37 °C. Durante a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão de degranulação de HEPES + BSA 0,04% para remover o meio e IgE não ligada. As células foram ressuspensas em tampão de degranulação de HEPES + BSA 0,04% e inoculadas a 3.000 células por poço na placa de ensaio para um volume de reação final de 50 µl. As células que foram sensibilizadas com IgE foram usadas apenas com anti-IgE como um controle positivo para degranulação. A placa de ensaio foi incubada 30 min a 37 °C para a degranulação ocorrer. Durante essa incubação, tampão de *p*-nitro-*N*-acetil-β-D-glucosamina (pNAG, Sigma) foi preparado pela sonicação de 3,5 mg/ml de pNAG em tampão de citrato (ácido cítrico 40 mM, fosfato de sódio dibásico 20 mM, pH 4,5). A liberação de β-hexosaminidase foi medida misturando-se 20 µl de sobrenadante celular com 40 µl de solução de pNAG em uma placa de 384 poços de fundo plano. Essa placa foi incubada por 1,5 hora a 37 °C, e a reação foi parada pela adição de 40 µl de solução de parada (glicina 400 mM, pH 10,7). A absorbância foi lida com o uso de um leitor de placas a $\lambda = 405$ nm com filtro de referência a $\lambda = 620$ nm.

[00770] Os controles de IgG de comprimento total usados nos ensaios de degranulação de mastócito são descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Controles de IgG de comprimento total usados nos ensaios de degranulação de mastócito

	Nome	Sequência de HC	Sequência de LC
Controle de IgG para J1	Ab1 Anti-cKIT	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
Controle de IgG para J2	Ab2 Anti-cKIT	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 49
Controle de IgG para J3	Ab3 Anti-cKIT	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 25
Controle de IgG para J4	Ab4 Anti-cKIT	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 84
Controle de IgG para J6	Anti-Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 150)	SEQ ID NO: 147

[00771] Conforme mostrado na Figura 3A, determinados clones da classe de anticorpo anti-cKIT antagonista são menos propensos a causar a degranulação de mastócito. Sugere-se adicionalmente que o fragmento Fab ou Fab' não tem a capacidade de causar degranulação de mastócito. Mediante a reticulação com um anticorpo específico para

Fab (Figura 3C-3J), a IgG de comprimento total, mas não o formato de Fab' anti-cKIT-toxina DAR4 mostra degranulação aumentada. Isso sugere que o fragmento Fab' não causa a degranulação de mastócito mesmo quando ligado e multimerizado em complexos maiores conforme poderia ser observado se um paciente tivesse desenvolvido ou tivesse anticorpos antifármacos pré-existentes que reconhecem fragmentos Fab ou Fab'.

Exemplo 7 Ablação in vivo de HSCs humanas do hospedeiro de camundongo

[00772] Para avaliar os agentes de teste para eficácia *in vivo* contra HSCs humanas, camundongos que são severamente imunodeficientes (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, Jackson Laboratory, número de estoque 005557, também conhecido como NSG) foram transplantados com HSCs humanas após irradiação subletal (250 RADS em um irradiador gama ¹³⁷Cs). Células-tronco hematopoiéticas CD34+ (HSCs) foram obtidas a partir de AllCells (número de catálogo CB008F-S). Cada frasco de ~1 milhão de células foi descongelado, diluído em 10 ml de 1X HBSS e centrifugado por 7 minutos a 1.200 rpm. O pélete celular foi ressuspenso em HBSS a 100.000 células/ml. Um total de 20.000 células foi transplantado por camundongo por meio de injeção retro-orbital 24 horas após a irradiação. As HSCs humanas foram deixadas enxertar nos camundongos NSG por pelo menos 4 semanas. O percentual de quimerismo humano foi determinado pela citometria de fluxo de amostras sanguíneas. Para isso, o sangue foi manchado com os seguintes anticorpos: CD45-e450 anti-humano (eBioscience, nº de catálogo 48-0459-42), CD45-APC anticamundongo (Becton Dickinson, nº de catálogo 559864), CD33-Pe anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 347787), CD19-FITC anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 555422) e CD3-PeCy7 anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 557851). Uma vez que o quimerismo humano foi confirmado,

os camundongos NSG humanizados foram dosados com um agente de teste por via intraperitoneal duas vezes ao dia. O grau de quimerismo humano foi reanalisado após a dosagem. Para avaliar a presença ou ausência de HSCs humanas, os camundongos foram eutanizados e a medula óssea foi isolada e manchada com os seguintes anticorpos: CD45-e450 anti-humano (eBioscience, nº de catálogo 48-0459-42), CD45-APC anticamundongo (Becton Dickinson, nº de catálogo 559864), CD34-PE anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 348057), CD38-FITC anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 340926), CD11b-PE anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 555388), CD33-PeCy7 anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 333946), CD19-FITC anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 555412) e CD3-PeCy7 anti-humano (Becton Dickinson, nº de catálogo 557851). As populações de células foram analisadas por meio de citometria de fluxo e analisadas com FlowJo.

[00773] Em um experimento particular, os camundongos foram dosados com 10 mg/kg de conjugado J7 (descrito na Tabela 2) duas vezes ao dia por 1, 2 ou 4 dias ou conjugado de controle de isotipo J8 duas vezes ao dia por 4 dias. Os camundongos foram eutanizados no dia 21 e sua medula óssea foi analisada. Conforme mostrado na Figura 4, os camundongos tratados com o conjugado J7 por até mesmo 1 dia mostraram depleção de HSCs humanas (CD45+ humanas, CD34+ humanas, CD38- humanas), enquanto que os camundongos tratados com o conjugado de controle de isotipo J8 mostraram quimerismo variável provavelmente devido à variação da humanização antes do tratamento, com base na comparação ao grupo tratado com veículo (PBS).

[00774] Em um experimento particular, os camundongos foram dosados com 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT J1, J2 ou J3 ou conjugado de controle de isotipo J6 por 2 dias. Os camundongos foram euta-

nizados no dia 21 e sua medula óssea foi analisada. Conforme mostrado na Figura 5, os camundongos tratados com um conjugado anti-cKIT J1, J2 ou J3 mostraram HSCs humanas reduzidas (CD45+ humanas, CD34+ humanas, CD38- humanas), enquanto que os camundongos tratados com o conjugado de controle de isotipo J6 mostraram quimerismo variável.

[00775] Em um experimento particular, os camundongos foram dosados com 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT JW, JX, JY ou JZ por 2 dias. Os camundongos foram eutanizados no dia 21 e sua medula óssea foi analisada. Conforme mostrado na Figura 13, os camundongos tratados com um conjugado anti-cKIT JW, JX, JY ou JZ mostraram HSCs humanas reduzidas (CD45+ humanas, CD34+ humanas, CD38- humanas).

[00776] Esses três experimentos em conjunto mostram que conjugados de Fab anti-cKIT-toxina ou Fab' anti-cKit-toxina tiveram a capacidade para depletar HSCs da medula óssea. Tanto os conjugados de Fab anti-cKIT-amanitina (por exemplo, J7) quanto os conjugados de Fab' anti-cKIT-auristatina (por exemplo, J1, J2, J3, JW, JX, JY) tiveram a capacidade de ablar HSCs humanas *in vivo*.

Exemplo 8 Ablação *in vivo* de HSCs de camundongos em camundongos imunocompetentes

[00777] Para avaliar os agentes de teste quanto à eficácia *in vivo* contra HSCs de camundongo, camundongos C57BL/6J (machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 000664) foram dosados com um agente de teste por via intraperitoneal duas vezes ao dia. O perfil de hematologia foi analisado tão cedo quanto um dia após a última dose ou até 21 dias após a última dose por métodos padrão. Para avaliar a presença ou ausência de HSCs de camundongo, os camundongos foram eutanizados e a medula óssea foi isolada e manchada com os seguintes anticorpos: CD45-PerCP-Cy5.5 anticamun-

dongo (Becton Dickinson, nº de catálogo 550994), cKIT-APC anticamundongo (Becton Dickinson, nº de catálogo 553356), CD48-FITC anticamundongo (eBioscience, nº de catálogo 11-0481-82), CD150-PE anticamundongo (BioLegend, nº de catálogo 115904), Sca-V450 anticamundongo (Becton Dickinson, nº de catálogo 560653), Lin-biotina anticamundongo (Miltenyi, nº de catálogo 120-001-547) e Pe-Cy7-estreptavidina (Becton Dickinson, nº de catálogo 557598). As populações de células foram analisadas por meio de citometria de fluxo e analisadas com FlowJo.

[00778] Em um experimento particular, os camundongos foram dosados duas vezes ao dia com 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT J4 ou J5 (descrito na Tabela 2) ou PBS por 4 dias. Os camundongos foram eutanizados no dia 13 para análise de medula óssea. Os grupos tratados com conjugado anti-cKIT J4 ou J5 mostraram níveis significativamente reduzidos de células-tronco e progenitoras (cKIT+) na medula óssea em comparação ao grupo de controle tratado com PBS (Figura 6), demonstrando que o tratamento com conjugados de Fab' anti-cKIT-auristatina, tais como J4 ou J5, teve a capacidade para ablar HSCs *in vivo* em camundongos normais.

[00779] A fim de determinar se a ablação por conjugados de anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-cKIT da invenção é suficiente para permitir transplante, os camundongos tratados conforme acima podem receber subsequentemente transplante de HSC. Por exemplo, camundongos CD45.2 tratados com conjugado de Fab' anti-cKIT-toxina podem ser transplantados com HSCs doadoras que são de camundongos CD45.1 aproximadamente uma semana após a dosagem. Em outro exemplo, os camundongos tratados com conjugado de Fab' anti-cKIT-toxina podem ser tratados com um agente imunossupressor, tal como um agente que causa a depleção de célula T aproximadamente uma semana após a dosagem e aproximadamente 1 a 2 dias

antes de serem transplantados com HSCs doadoras que são de camundongos CD45.1. Um método para a depleção de célula T é dosar camundongos com 0,5 mg por camundongo de anticorpo de cadeia TCR β anticamundongo (clone H57-597; Biolegend) quatro vezes ao dia por dois dias. A depleção de célula T pode ser confirmada retirando-se uma amostra sanguínea para perfilagem de hematologia após a dosagem. Em tais exemplos, o progresso do transplante seria monitorado procurando-se por quimerismo CD45.1 em amostras sanguíneas. Em tais exemplos, o sucesso do transplante pode ser determinado pela eutanásia dos camundongos aproximadamente 3 a 4 meses ou 5 a 6 meses após o transplante para análise de medula óssea procurando por populações de HSCs CD45.1 e CD45.2. Alternativamente, o transplante bem-sucedido pode ser determinado pela eutanásia dos camundongos pelo menos 4 ou 6 meses após o transplante primário e realizando o transplante secundário em camundongos hospedeiros completamente irradiados e procurando por quimerismo CD45.1 nas amostras sanguíneas após o transplante secundário.

Exemplo 9 Ensaio in vitro da degranulação de mastócito humano por anticorpo anti-cKIT de comprimento total, fragmentos F(ab')₂ e Fab do mesmo e conjugados dos mesmos

[00780] Mastócitos maduros foram gerados e testados com anticorpo anti-cKIT e fragmentos F(ab')₂ e Fab ou conjugados de toxina dos mesmos conforme descrito no Exemplo 6.

[00781] Conforme mostrado nas Figuras 7A a 7C, Ab4 anti-cKIT de comprimento total (HC-E152C-S375C) e fragmento F(ab')₂ (HC-E152C) conjugado com composto (4) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab4 (HC-E152C) em todas as concentrações testadas. As Figuras 7D a 7F mostram que Ab3 anti-cKIT de comprimento total (HC-E152C-S375C) e fragmento F(ab')₂ (HC-

E152C) conjugado ao composto (3) causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab3 (E152C) conjugado ao composto (4) em todas as concentrações testadas. Isso sugere que o fragmento Fab ou conjugados do mesmo não causam a degranulação de mastócito mesmo quando ligados e multimerizados em complexos maiores conforme poderia ser observado se um paciente tivesse desenvolvido ou tivesse anticorpos antifármacos pré-existentes que reconhecem fragmentos Fab. Por outro lado, fragmentos $F(ab')_2$ e conjugados causam degranulação de mastócito em um nível similar ao anticorpo anti-cKIT de comprimento total quando ligados e multimerizados em complexos maiores.

Exemplo 10 Ensaio in vitro da degranulação de mastócito humano por anticorpo anti-cKIT de comprimento total e fragmentos $F(ab')_2$ e Fab do mesmo

[00782] Mastócitos maduros foram gerados e testados com anticorpo anti-cKIT e fragmentos $F(ab')_2$ e Fab conforme descrito no Exemplo 6.

[00783] Conforme mostrado nas Figuras 8A a 8C, Ab4 anti-cKIT de comprimento total e fragmento $F(ab')_4$ causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab4 (HC-E152C) em todas as concentrações testadas. As Figuras 8D a 8F mostram que Ab1 anti-cKIT de comprimento total e fragmento $F(ab')_1$ causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab1 (HC-E152C) em todas as concentrações testadas. As Figuras 8G a 8I mostram que Ab2 anti-cKIT de comprimento total e fragmento $F(ab')_2$ causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab2 (HC-E152C) em todas

as concentrações testadas. As Figuras 8J a 8L mostram que Ab3 anti-cKIT de comprimento total e fragmento $F(ab'3)_2$ causaram degranulação de mastócito quando reticulado, enquanto nenhuma degranulação de mastócito foi acionada por fragmento Fab3 (HC-E152C) em todas as concentrações testadas. Isso sugere que os fragmentos Fab não causam a degranulação de mastócito mesmo quando ligados e multimerizados em complexos maiores conforme poderia ser observado se um paciente tivesse desenvolvido ou tivesse anticorpos antifármacos pré-existentes que reconhecem fragmentos Fab. Por outro lado, fragmentos $F(ab')_2$ causam degranulação de mastócito em um nível similar ao anticorpo anti-cKIT de comprimento total quando ligados e multimerizados em complexos maiores.

Exemplo 11 Transplante de medula óssea singeneico em camundongos imunocompetentes

[00784] Em um experimento particular, camundongos C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 000664) foram dosados com 2,5, 5 ou 10 mg/ml de Fab'5-(1) anti-cKIT (Fab'-DAR4) em uma minibomba (Alzet, nº de catálogo 2001) colocada subcutaneamente nas costas. A minibomba manteve um volume de 200 μ l e infundiu em uma taxa constante de 1 μ l/hora, ao longo do curso de 7 dias. Sete dias após a minibomba ter sido implantada, a mesma foi, então, removida para deter qualquer administração adicional do fármaco. Quarenta e oito horas após a remoção da minibomba, os camundongos foram transplantados com medula óssea dos camundongos doadores que foram congenicamente marcados em CD45 (CD45.1, B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 002014). O progresso do transplante foi monitorado no sangue periférico procurando-se por quimerismo CD45.1 em intervalos de um mês. Nesse experimento, o quimerismo do sangue foi monitorado por 4 meses conforme mostrado na Figura

10. O quimerismo no sangue periférico foi analisado por citometria de fluxo. As amostras sanguíneas foram manchadas com anti-mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (1:100, BD nº 560580), anti-mCD45.2-BUV395 (1:100, BD nº 564616), anti-Mac-PE (1:500, BD nº 553331), anti-GR1-FITC (1:100, BD nº 553127), anti-B220-APC (1:400, BD nº 553092) e anti-CD3-V450 (1:100, BD nº 560801) adquiridas em um citômetro de fluxo Fortessa (Becton Dickinson) e analisadas com software FlowJo (TreeStar). O nível de quimerismo foi determinado comparando-se populações que eram positivas para CD45.2 (hospedeiro) ou CD45.1 (doador). O quimerismo de doador total representou a população de glóbulos brancos geral. Adicionalmente, as subpopulações de células T, células B e células mieloides foram adicionalmente analisadas quanto ao quimerismo de doador. O quimerismo de doador de célula T foi baseado na procura em CD45.2 (hospedeiro) versus CD45.1 (doador) em células CD3+. O quimerismo de doador de célula B foi baseado na procura em CD45.2 (hospedeiro) versus CD45.1 (doador) em células CD45R+. O quimerismo mielóide foi baseado na procura em CD45.2 (hospedeiro) versus CD45.2 (doador) em células Mac-1+/Gr-1+. Esse experimento mostra que camundongos condicionados com um conjugado de Fab' anti-cKit podem ser enxertados com células doadoras que reconstituem as linhagens mieloides, de células B e células T que são indicativas de enxertia de HSC bem-sucedida.

[00785] Em outro experimento, camundongos C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 000664) foram dosados com 2,5, 5 ou 10 mg/ml de Fab'5-(1) anti-c-KIT (Fab'-DAR4) ou 10 mg/ml de Fab'5-mc-MMAF anti-c-KIT (Fab'-DAR4) em uma minibomba (Alzet, nº de catálogo 2001) colocada subcutaneamente nas costas. A minibomba manteve um volume de 200 µl e infundiu em uma taxa constante de 1 µl/hora, ao longo do curso de 7 dias. Cinco dias após a minibomba ter sido implantada, a mesma foi,

então, removida para deter qualquer administração adicional do fármaco. Dentro de 24 horas após a remoção da minibomba, os camundongos foram, então, transplantados com medula óssea dos camundongos doadores que foram congenicamente marcados em CD45 (CD45.1, B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 002014). O progresso do transplante foi monitorado no sangue periférico procurando-se por quimerismo CD45.1 em intervalos de um mês. Nesse experimento, o quimerismo do sangue foi monitorado por 2 meses conforme mostrado na Figura 11. O quimerismo no sangue periférico foi analisado por citometria de fluxo. As amostras sanguíneas foram manchadas com (anti-mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (1:100, BD nº 560580), anti-mCD45.2-BUV395 (1:100, BD nº 564616), anti-Mac-PE (1:500, BD nº 553331), anti-GR1-FITC (1:100, BD nº 553127), anti-B220-APC (1:400, BD nº 553092) e anti-CD3-V450 (1:100, BD nº 560801)), adquiridas em um citômetro de fluxo Fortessa (Becton Dickinson) e analisadas com software FlowJo (TreeStar). O nível de quimerismo foi determinado comparando-se populações que eram positivas para CD45.2 (hospedeiro) ou CD45.1 (doador). O quimerismo de doador total representou a população de glóbulos brancos geral. Adicionalmente, as células mieloides no sangue periférico foram adicionalmente analisadas quanto ao quimerismo de doador. O quimerismo mielóide foi baseado na procura em CD45.2 (hospedeiro) versus CD45.2 (doador) em células Mac-1+/Gr-1+. Esse experimento mostra que camundongos condicionados com um conjugado de anti-cKit-Fab' podem ser enxertados de modo bem-sucedido com células doadoras que reconstituem o compartimento mielóide a de um modo similar aos camundongos condicionados com irradiação letal (Figura 11B). Os níveis mais baixos de quimerismo de doador total em camundongos condicionados com anti-cKit em relação aos camundongos irradiados (Figura 11A) são provavelmente devido à natu-

reza mais alvejada do agente de condicionamento de anti-cKit que não remove células T e células B CD45.2+ de vida longa da circulação.

[00786] Em outro experimento, camundongos C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 000664) foram irradiados com 300 RADS. Após três dias, os mesmos foram dosados com 2,5 ou 5 mg/ml de Fab'5-(1) anti-c-KIT (Fab'-DAR4) em uma minibomba (Alzet, nº de catálogo 2001) colocada subcutaneamente nas costas. Um grupo foi tratado apenas com irradiação e um grupo foi tratado apenas com 2,5 mg/ml de Fab'5-(1) anti-c-KIT (Fab'-DAR4). A minibomba manteve um volume de 200 µl e infundiu em uma taxa constante de 1 µl/hora, ao longo do curso de 7 dias. Três dias após a minibomba ter sido implantada, a mesma foi, então, removida para deter qualquer administração adicional do fármaco. Dentro de 48 horas após a remoção da minibomba, os camundongos foram, então, transplantados com medula óssea dos camundongos doadores que foram congenicamente marcados em CD45 (CD45.1, B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ, machos, 10 semanas de idade, Jackson Laboratory, estoque nº 002014). O progresso do transplante foi monitorado no sangue periférico procurando-se por quimerismo CD45.1 em intervalos de um mês. Nesse experimento, o quimerismo do sangue foi monitorado por 4 meses conforme mostrado na Figura 12. O quimerismo no sangue periférico foi analisado por citometria de fluxo. As amostras sanguíneas foram manchadas com (anti-mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (1:100, BD nº 560580), anti-mCD45.2-BUV395 (1:100, BD nº 564616), anti-Mac-PE (1:500, BD nº 553331), anti-GR1-FITC (1:100, BD nº 553127), anti-B220-APC (1:400, BD nº 553092) e anti-CD3-V450 (1:100, BD nº 560801)), adquiridas em um citômetro de fluxo Fortessa (Becton Dickinson) e analisadas com software FlowJo (TreeStar). O nível de quimerismo foi determinado comparando-se populações que eram positivas para CD45.2 (hospedeiro) ou CD45.1 (doador). O qui-

merismo de doador total representou a população de glóbulos brancos geral. Adicionalmente, as células mieloides no sangue periférico foram adicionalmente analisadas quanto ao quimerismo de doador. O quimerismo mieloide foi baseado na procura em CD45.2 (hospedeiro) versus CD45.2 (doador) em células Mac-1+/Gr-1+. Esse experimento mostra que o conjugado de anti-cKit-Fab' pode ser usado como um agente de condicionamento em combinação com outros agentes, tais como irradiação de baixa dose, e que camundongos condicionados desse modo podem ser enxertados de modo bem sucedido com células doadoras.

[00787] A não ser que definido de outro modo, os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que o usualmente entendido por um especialista familiarizado com o campo ao qual a descrição pertence.

[00788] A não ser que indicado de outro modo, todos os métodos, etapas, técnicas e manipulações que não são especificamente descritos em detalhes podem ser realizados e foram realizados de uma maneira conhecida por si, conforme ficará claro para a pessoa versada na técnica. Referência é, por exemplo, feita novamente aos manuais padrão e aos antecedentes da técnica gerais mencionados no presente documento e às referências adicionais citadas no presente documento. A não ser que indicado de outro modo, cada uma das referências citadas no presente documento é incorporada em sua totalidade a título de referência.

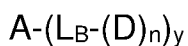
[00789] As reivindicações da invenção não são limitantes e são fornecidas abaixo.

[00790] Embora aspectos e reivindicações particulares tenham sido revelados no presente documento em detalhes, isso foi feito a título de exemplo para propósitos de ilustração apenas e não se destina a limitar em relação ao escopo das reivindicações anexas, ou o escopo da matéria das reivindicações de qualquer pedido futuro correspondente.

Em particular, é contemplado pelos inventores que várias substituições, alterações e modificações podem ser feitas à descrição sem se afastar do espírito e escopo da descrição conforme definido pelas reivindicações. Acredita-se que a escolha do material de partida de ácido nucleico, clone de interesse ou tipo de biblioteca é uma questão de rotina para uma pessoa de habilidade comum na técnica com conhecimento dos aspectos descritos no presente documento. Considera-se que outros aspectos, vantagens e modificações sejam abrangidos pelo escopo das reivindicações a seguir. Os peritos na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar utilizando não maior do que experimentação de rotina, muitos equivalentes dos aspectos específicos da invenção descrita no presente documento. Tais equivalentes são destinados a serem abrangidos pelas reivindicações a seguir. A reformulação do escopo da reivindicação em pedidos correspondentes posteriormente depositados pode ser devido às limitações pelas leis de patente dos vários países e não deve ser interpretada como desistindo da matéria das reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;



Fórmula (I)

caracterizado pelo fato de que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano;

L_B é um ligante;

D é um agente citotóxico;

n é um número inteiro de 1 a 10, e

y é um número inteiro de 1 a 10.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que y é 1, 2, 3 ou 4.

4. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que cada D é um agente citotóxico independentemente selecionado dentre uma auristatina, uma amanitina, um maitansinoide ou uma saporina.

5. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que cada D é um agente citotóxico independentemente selecionado dentre uma auristatina, uma amanitina ou um maitansinoide.

6. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que cada D é um agente citotóxico independentemente selecionado dentre uma auristatina ou uma amanitina.

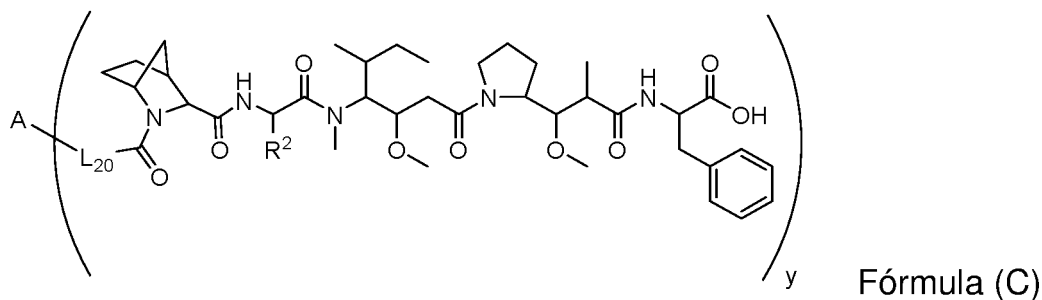
7. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que cada L_B é independente-

mente selecionado dentre um ligante passível de clivagem ou um ligante não passível de clivagem.

8. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que cada L_B é um ligante passível de clivagem.

9. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que cada L_B é um ligante não passível de clivagem.

10. Conjugado, caracterizado pelo fato de que tem a estrutura de Fórmula (C):



em que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano;

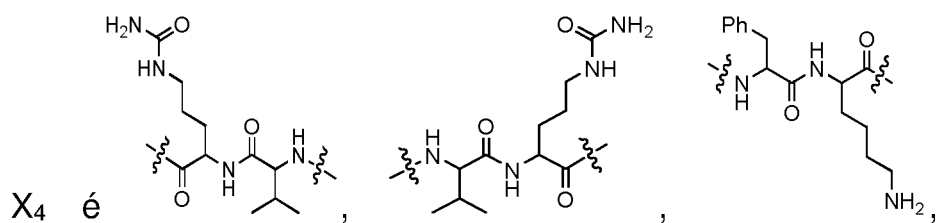
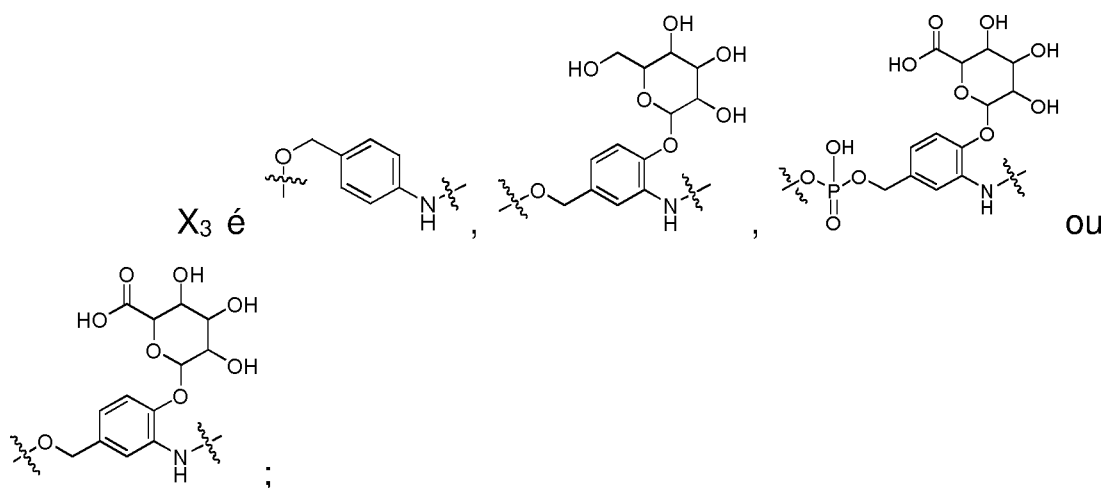
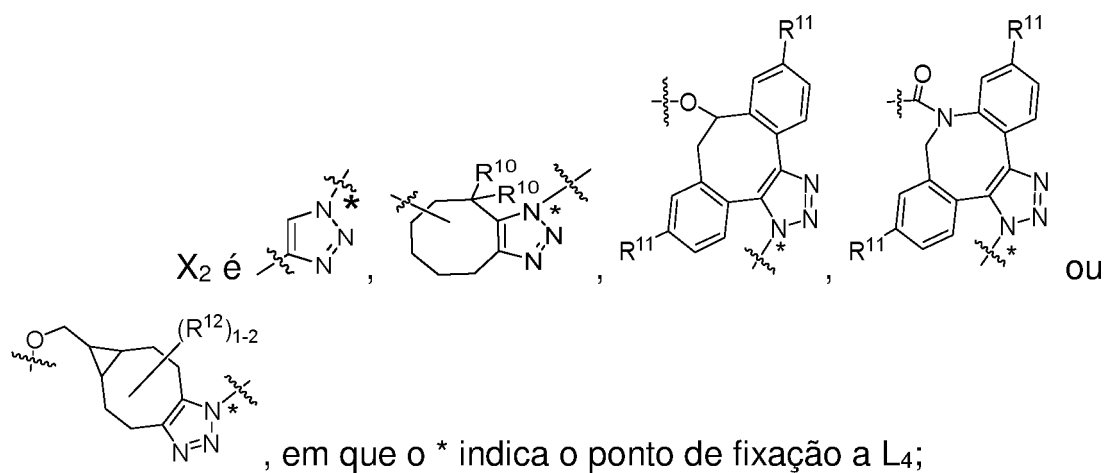
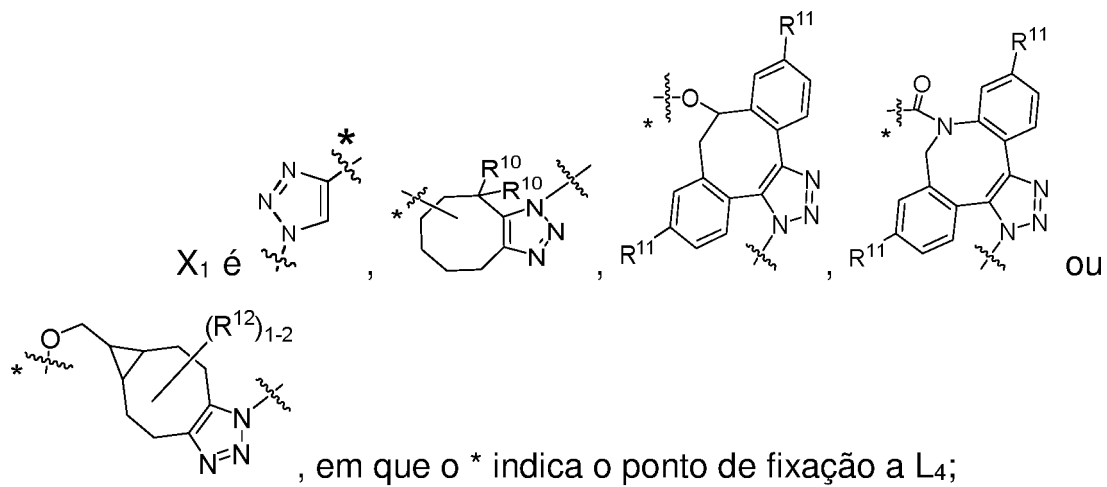
y é um número inteiro de 1 a 10;

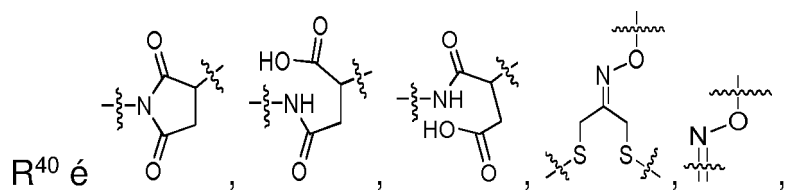
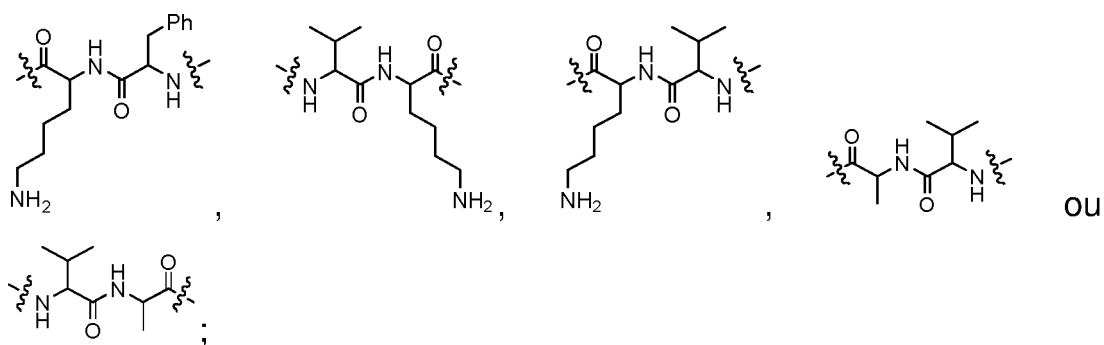
R^2 é C_1 - C_6 alquila;

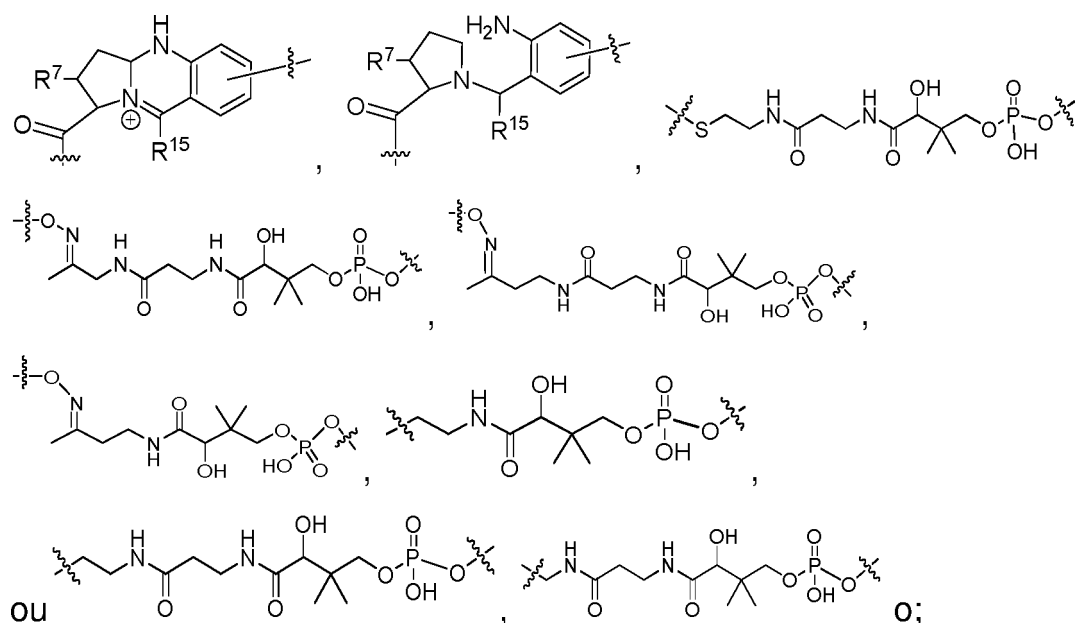
L_{20} é $-L_1R^{40}$;

L_1 é $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_m^-$,
 $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$, $-((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-(CH_2)_mC(R_7)_2^-$,
 $-(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$ ou
 $-(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;

L_4 é $-((CH_2)_m)$;







cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, e -OH;

cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, - NH_2 , - OCH_3 , - OCH_2CH_3 , - $N(CH_3)_2$, -CN, - NO_2 e -OH;

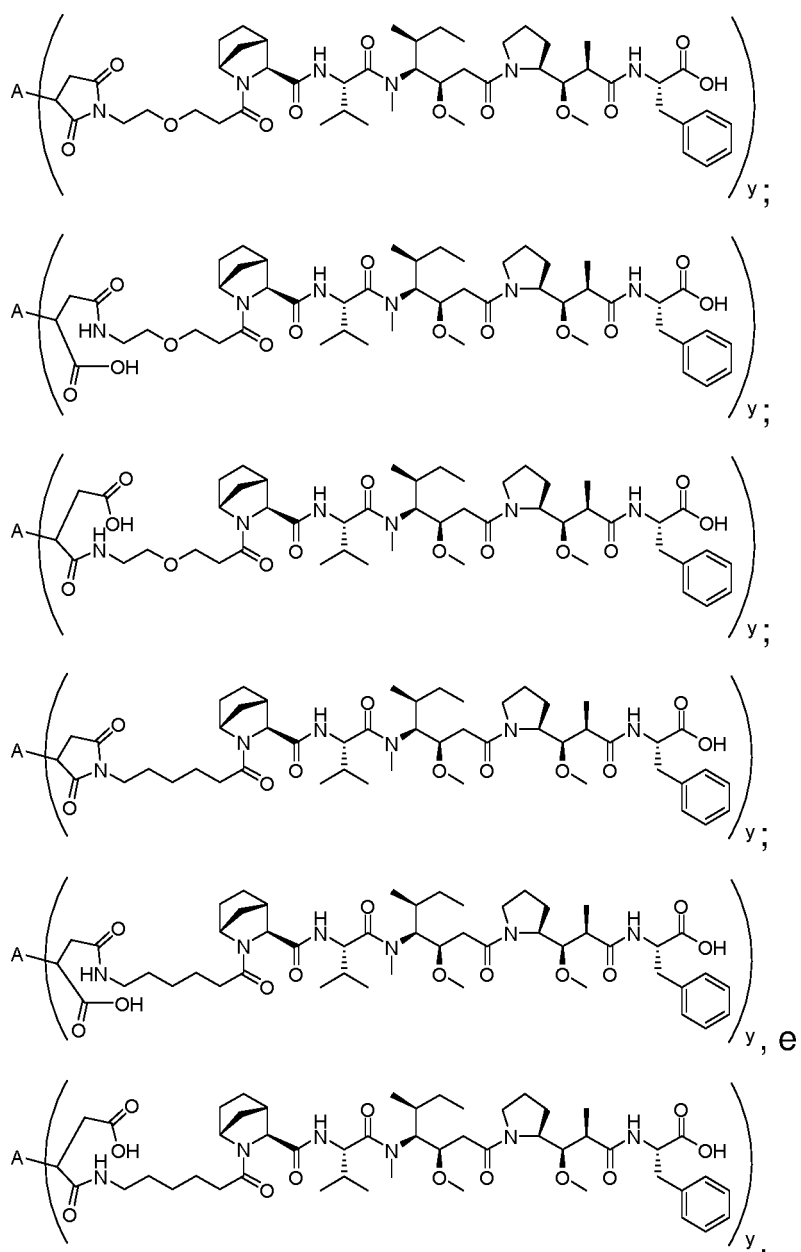
cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C_{1-4} alcóxi substituído por -C(=O)OH e C_{1-4} alquila substituída por -C(=O)OH;

cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, - CH_3 e fenila;

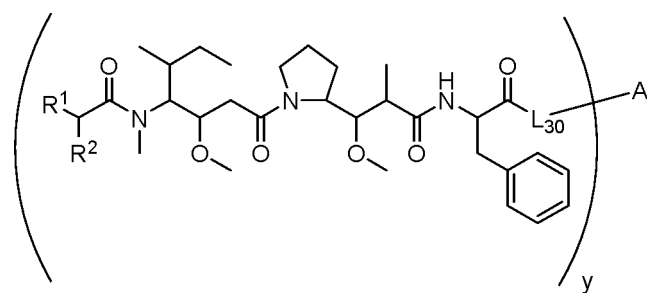
cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

11. Conjugado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre



12. Conjugado, caracterizado pelo fato de que tem a estrutura de Fórmula (D):



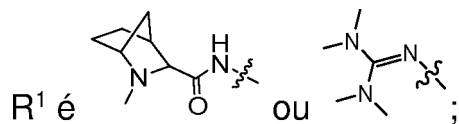
Fórmula (D)

em que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente

a cKIT humano;

y é um número inteiro de 1 a 10;

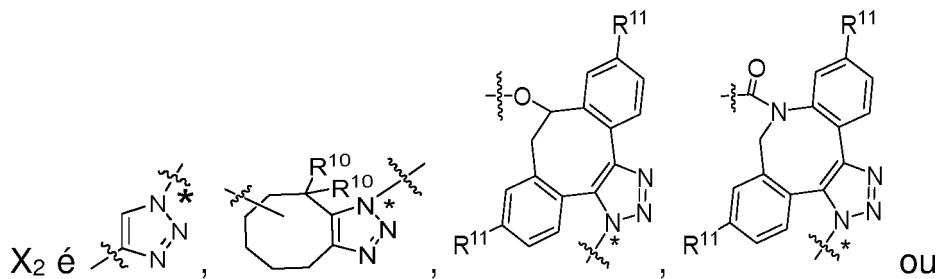
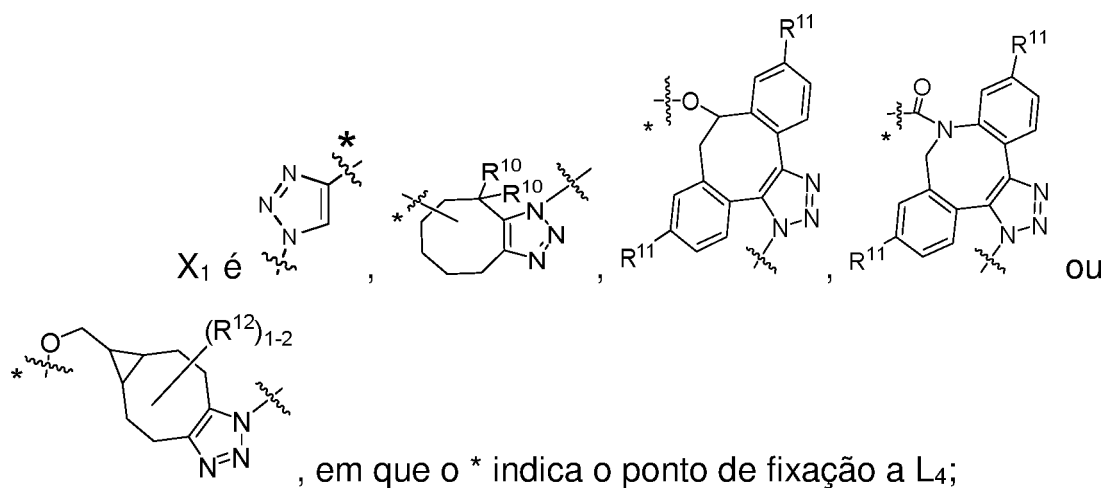


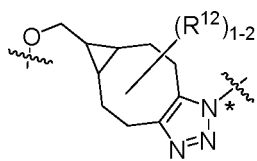
R^2 é C_1 - C_6 alquila;

L_{30} é $-L_5R^{40}$;

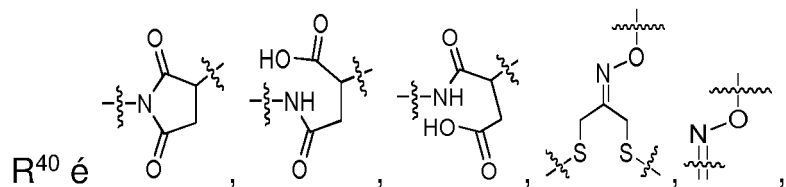
L_4 é $-((CH_2)_m)$;

L_5 é $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4^-$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4^-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$, $-NH(CH_2)_m^-$,
 $-NH(CH_2)_mX_1(CH_2)_m^-$, $-NH(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$,
 $-NH(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$,
 $-NH((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m^-$, $-NH(CH_2)_nC(R_7)_2^-$,
 $-NH(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^-$ ou
 $-NH(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^-$;





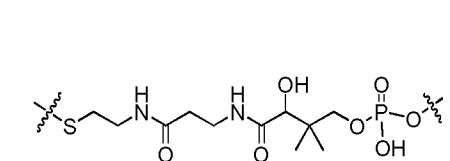
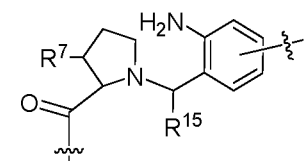
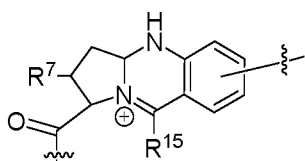
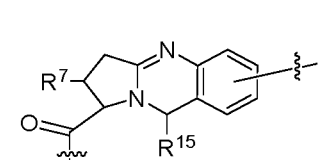
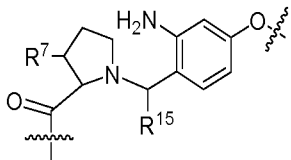
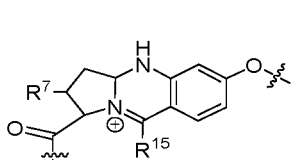
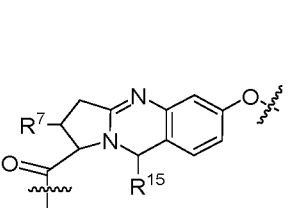
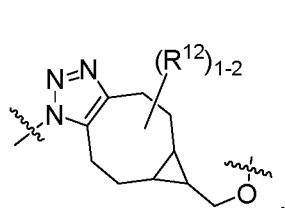
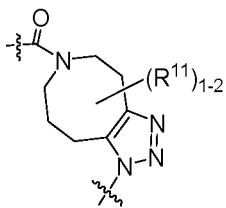
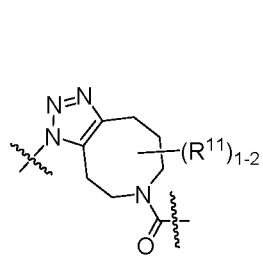
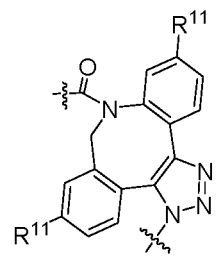
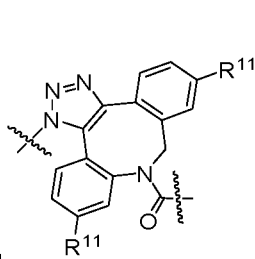
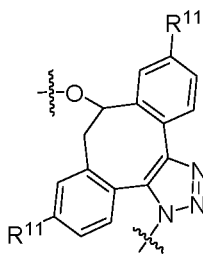
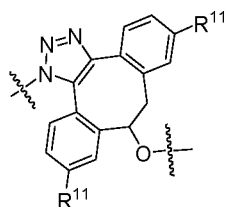
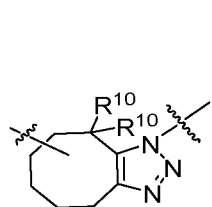
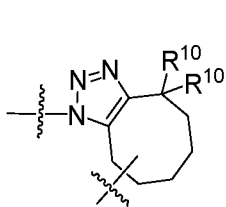
, em que o * indica o ponto de fixação a L_4 ;

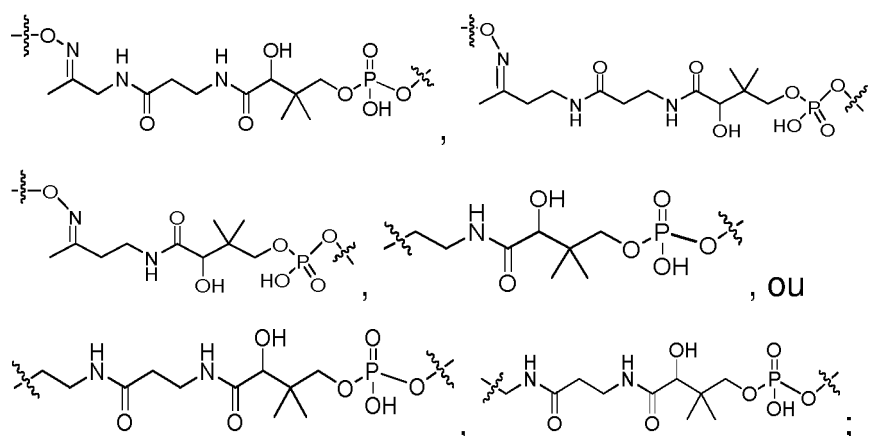


$-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$,

$-(\text{CH}_2)_2\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NR}^7\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$,

$-\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{S}-$,





cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1 - C_6 alquila;

cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, e -OH;

cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e -OH;

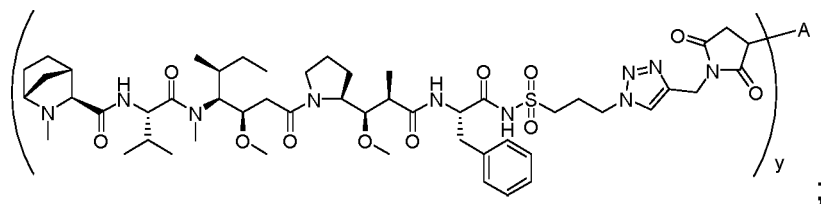
cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1 - C_6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

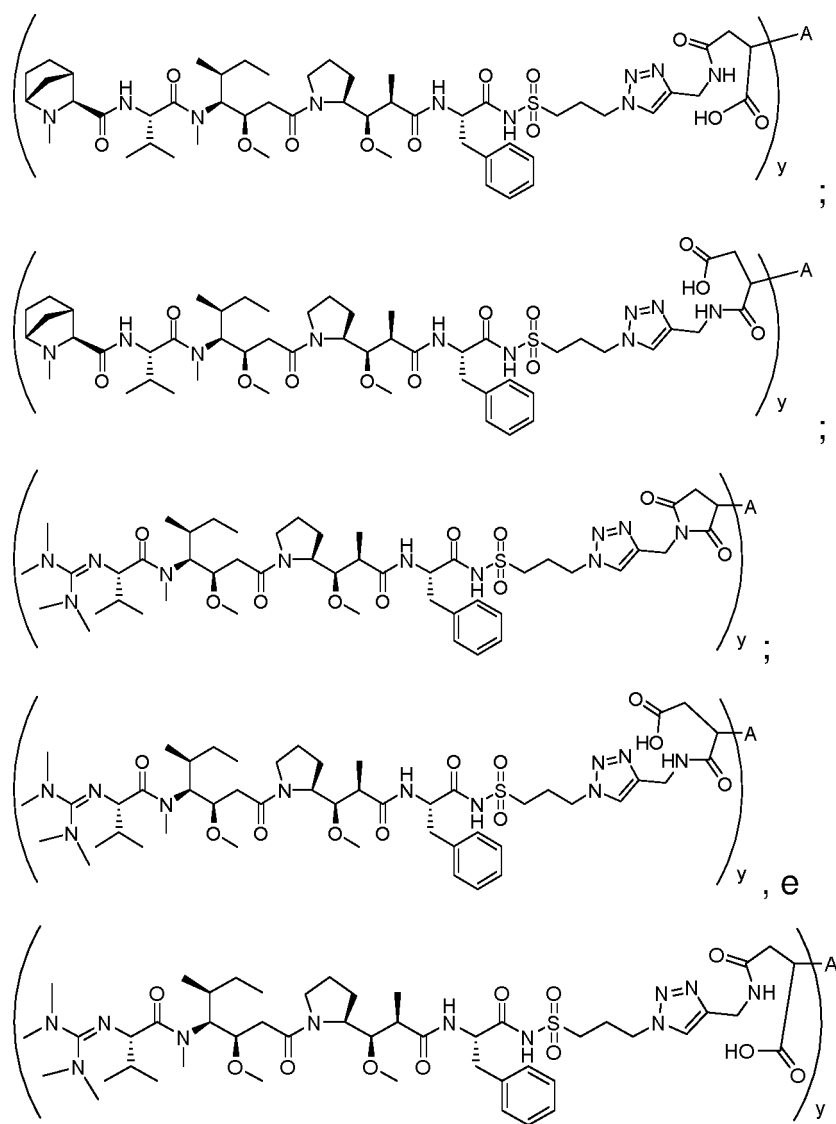
cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, $-CH_3$ e fenila;

cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

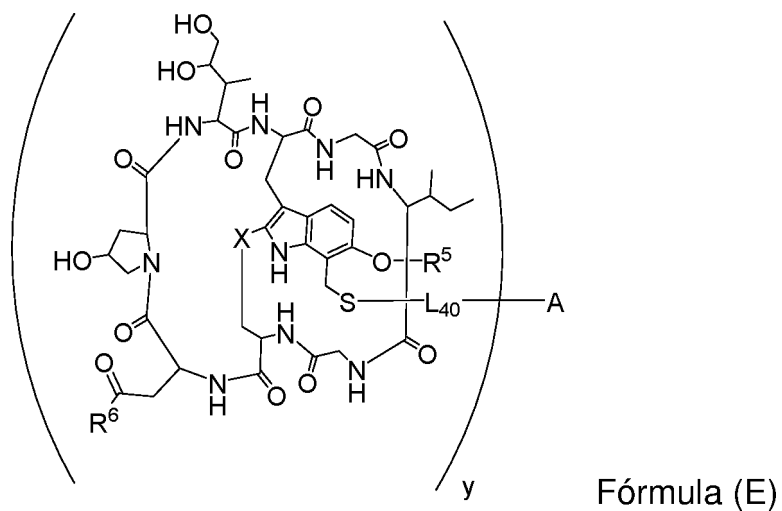
cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

13. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre





14. Conjugado, caracterizado pelo fato de que tem a estrutura de Fórmula (E):



em que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano;

y é um número inteiro de 1 a 10;

X é S(=O), S(=O)₂ ou S;

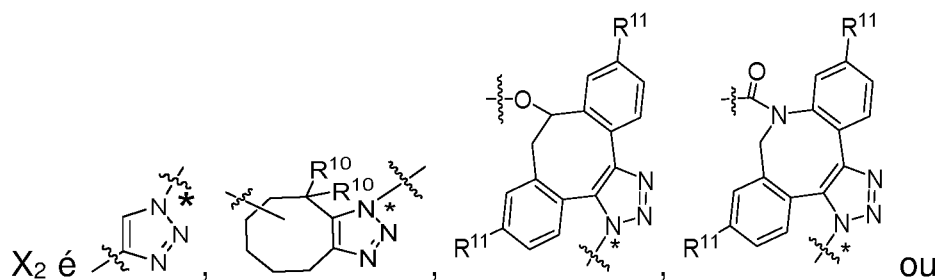
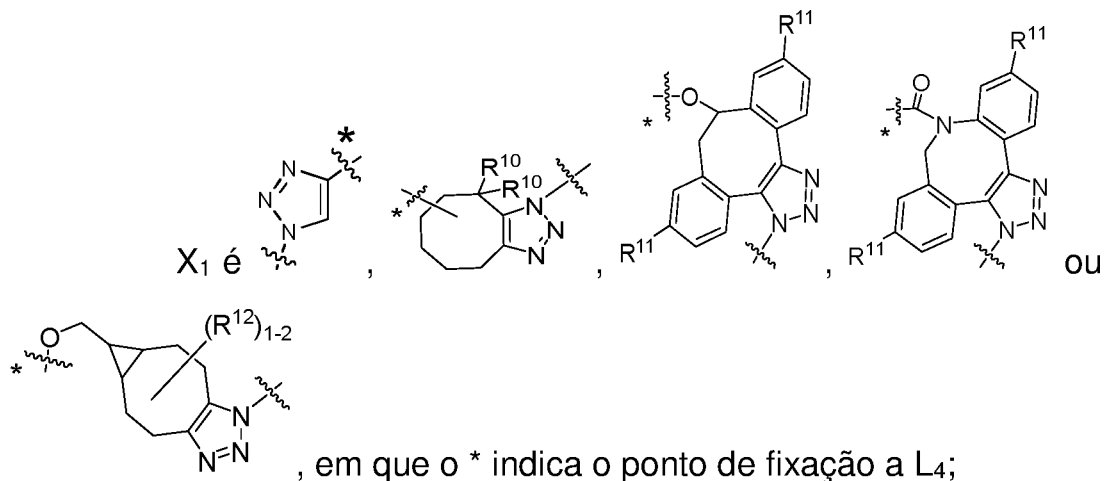
R⁵ é H, -CH₃ ou -CD₃;

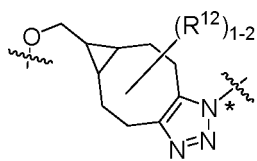
R⁶ é -NH₂ ou -OH;

L₄₀ é -L₆R⁴⁰;

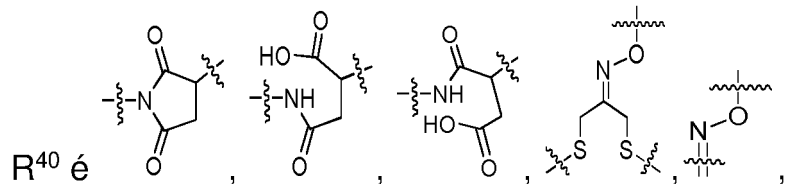
L₆ é -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻,
 -L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄⁻, -L₄NHC(=O)NH
 ((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄⁻, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_m⁻,
 -(CH₂)_mX₁(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻,
 -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
 -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m, -((CH₂)_mO)_pCH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m⁻,
 -(CH₂)_mC(R₇)₂⁻ ou -(CH₂)_mC(R₇)₂SS(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻;

L₄ é -((CH₂)_m;





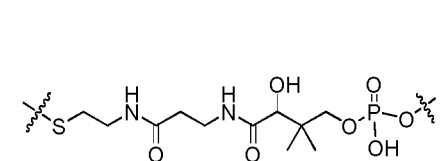
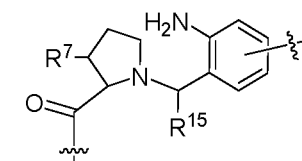
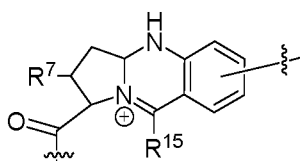
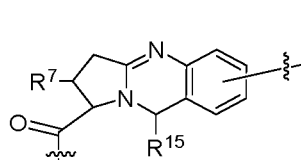
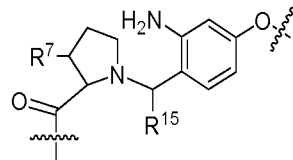
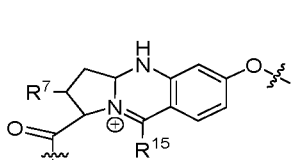
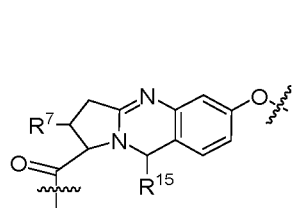
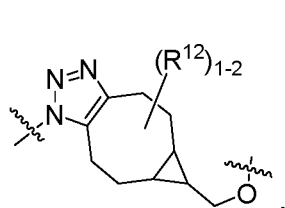
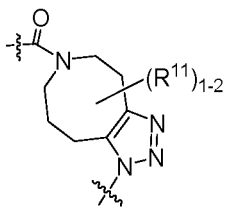
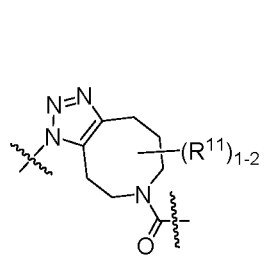
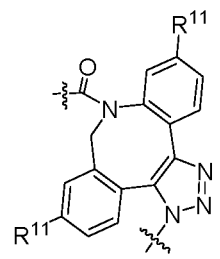
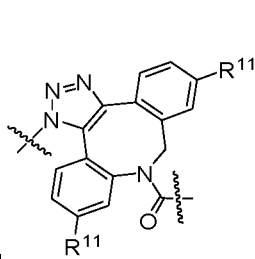
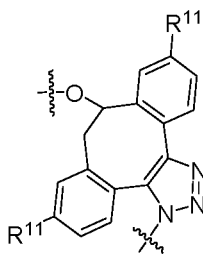
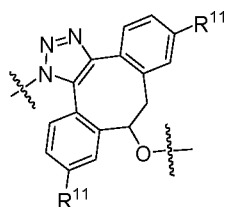
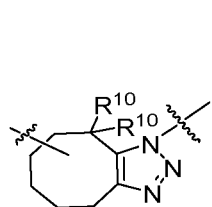
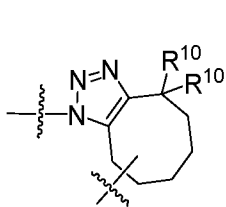
, em que o * indica o ponto de fixação a L_4 ;

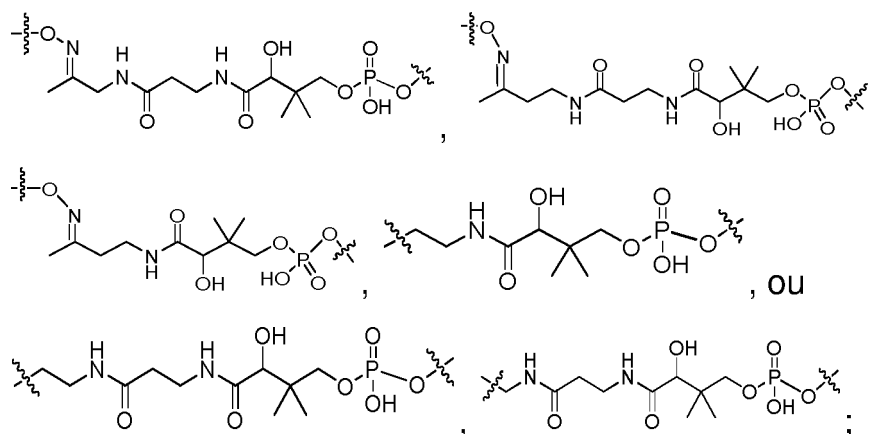


$\text{---NR}^7\text{C(=O)CH}_2\text{---}$, $\text{---NHC(=O)CH}_2\text{---}$, $\text{---S(=O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$,

$\text{---(CH}_2)_2\text{S(=O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$, $\text{---NR}^7\text{S(=O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$, $\text{---NR}^7\text{C(=O)CH}_2\text{CH}_2\text{---}$,

---NH--- , ---C(=O)--- , ---NHC(=O)--- , $\text{---CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{---}$, $\text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{---}$, ---S--- ,





cada R^7 é independentemente selecionado de H e C_1-C_6 alquila;

cada R^{10} é independentemente selecionado dentre H, C_1-C_6 alquila, F, Cl, e -OH;

cada R^{11} é independentemente selecionado dentre H, C_1-C_6 alquila, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ e -OH;

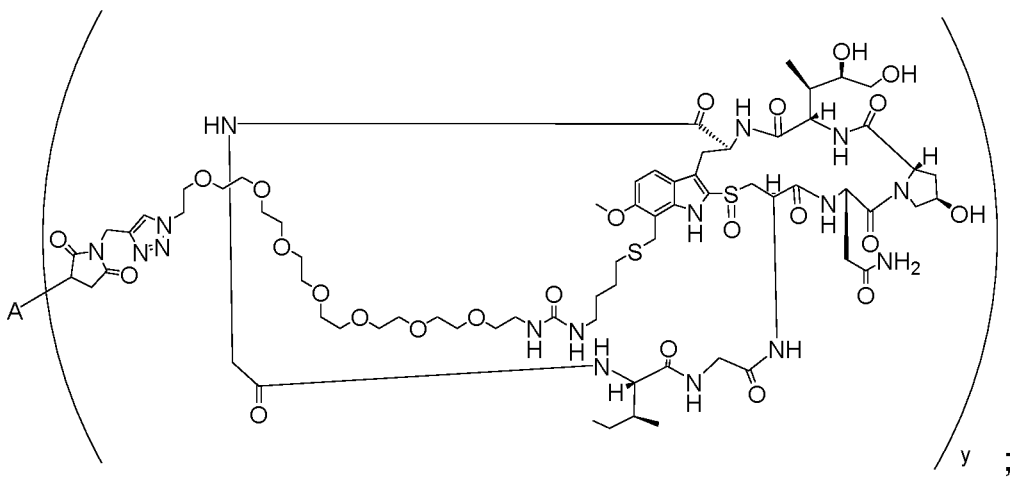
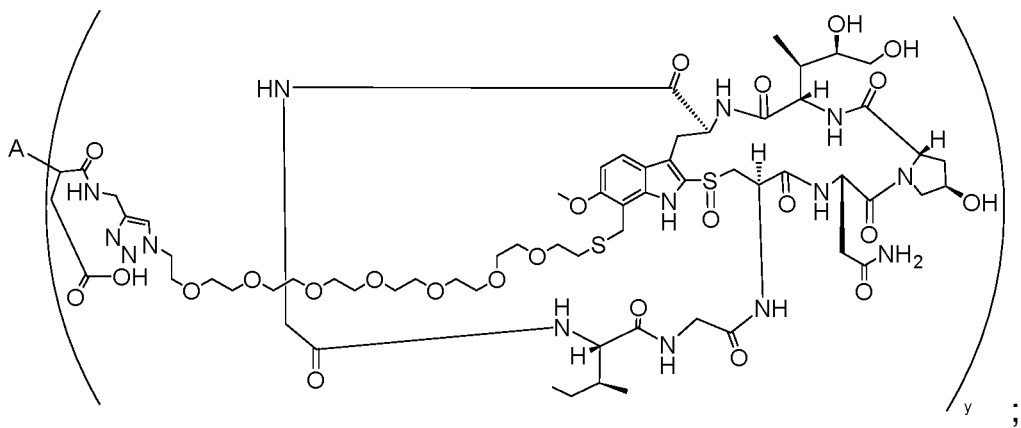
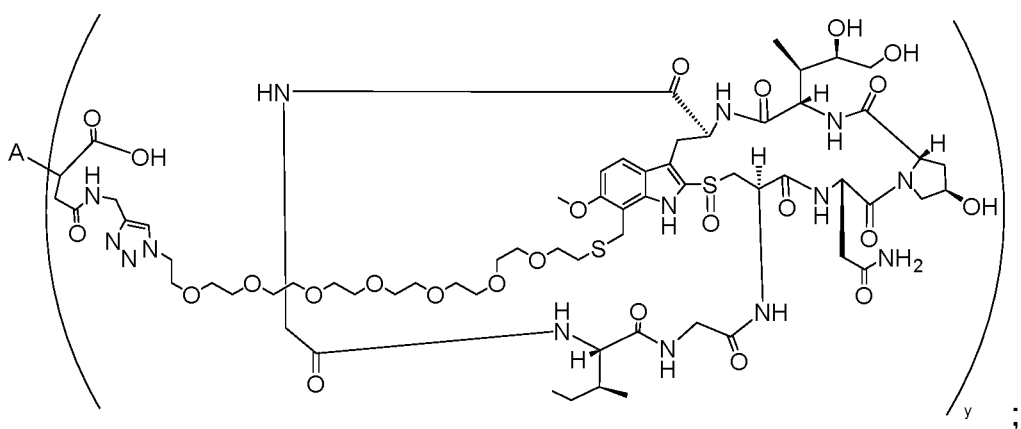
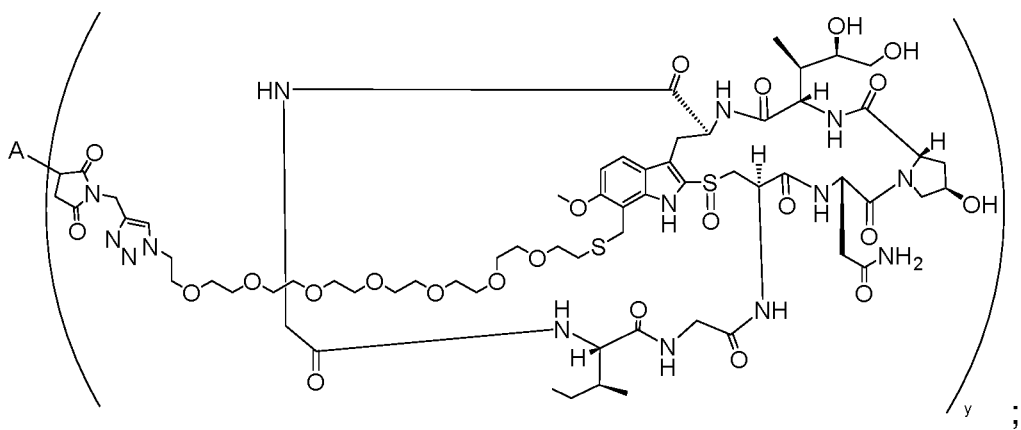
cada R^{12} é independentemente selecionado dentre H, C_1-6 alquila, flúor, benzilóxi substituído por $-C(=O)OH$, benzila substituída por $-C(=O)OH$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-C(=O)OH$ e C_{1-4} alquila substituída por $-C(=O)OH$;

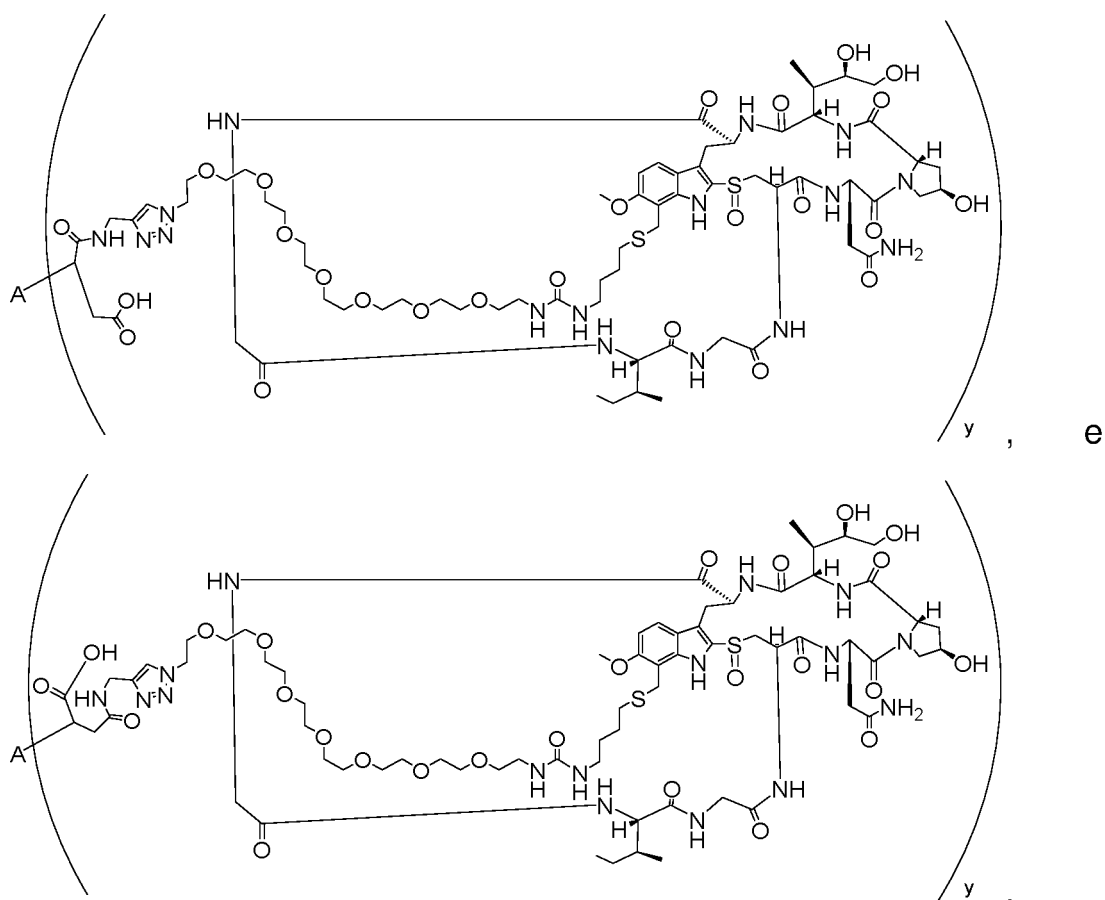
cada R^{15} é independentemente selecionado dentre H, $-CH_3$ e fenila;

cada m é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e

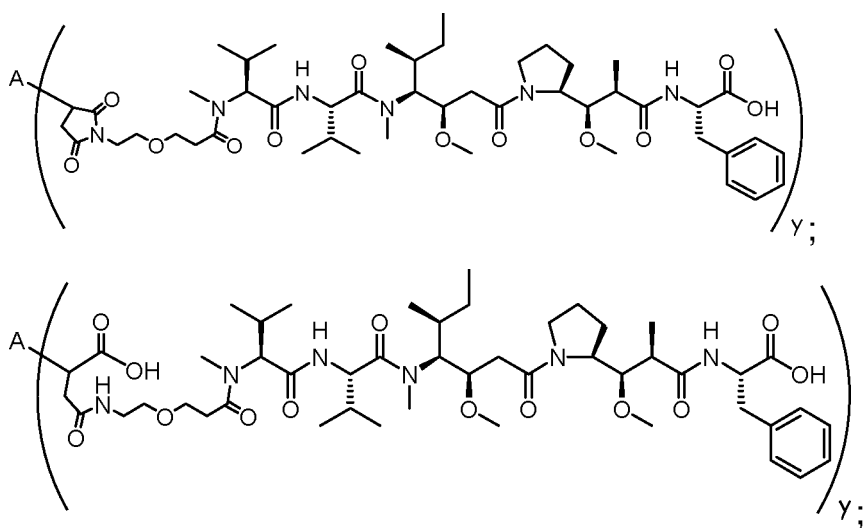
cada p é independentemente selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

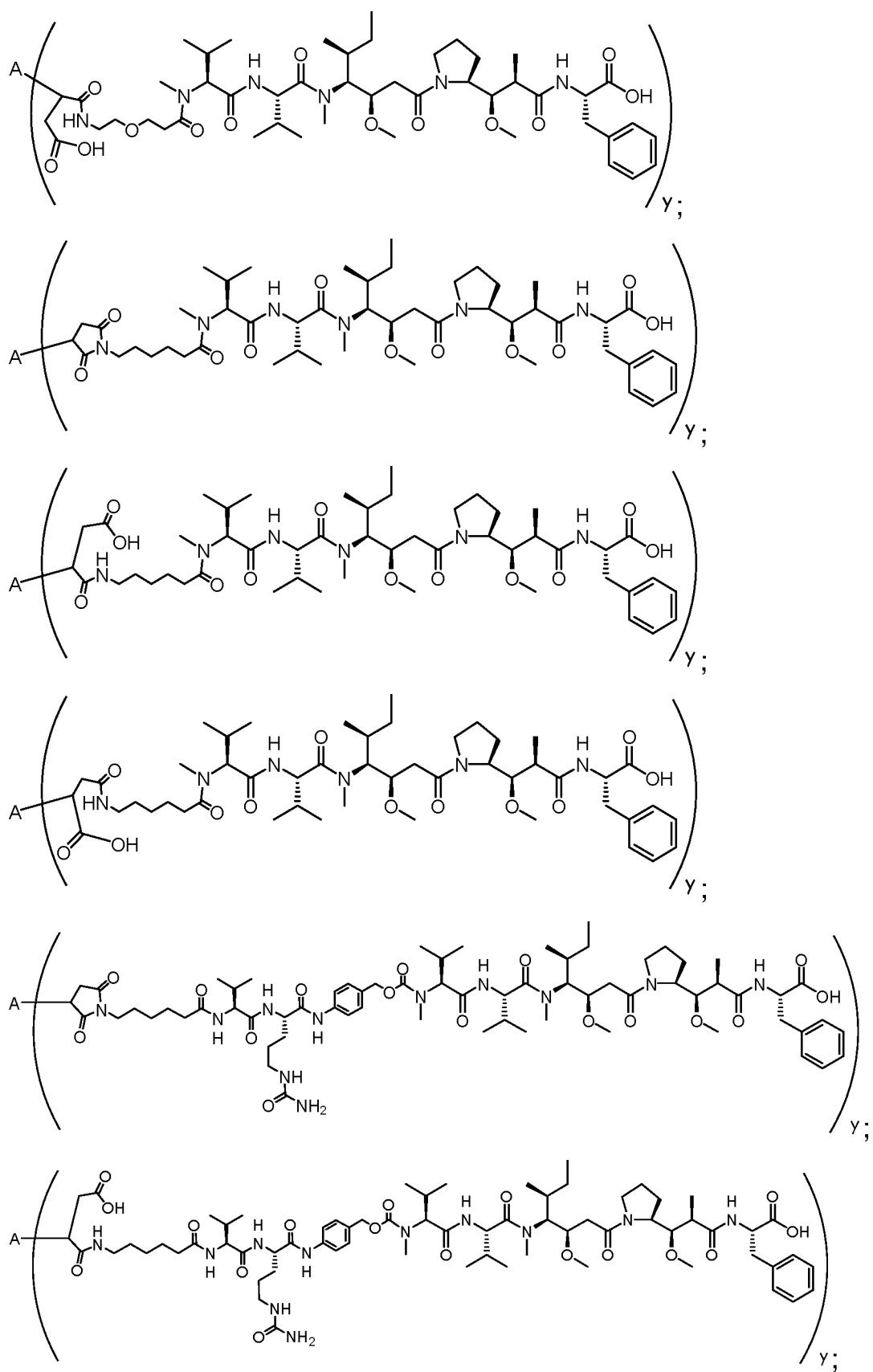
15. Conjugado, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:

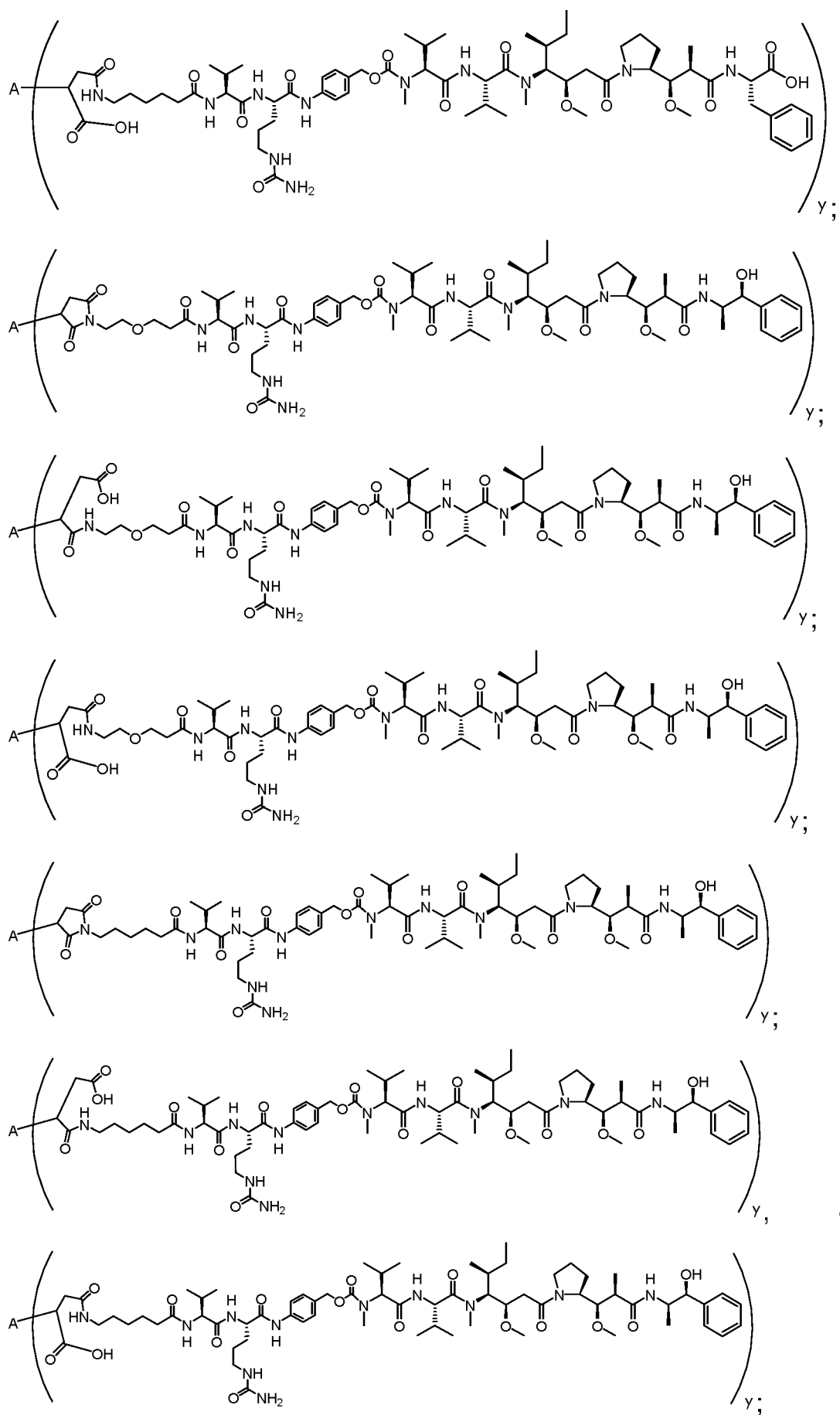




16. Conjugado, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:





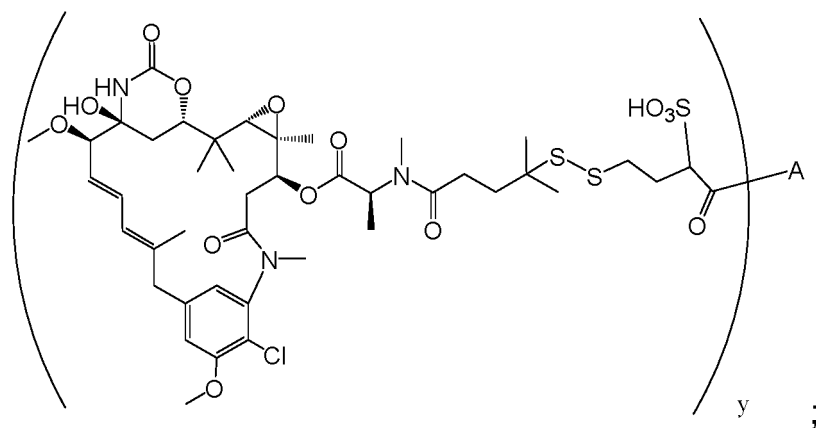
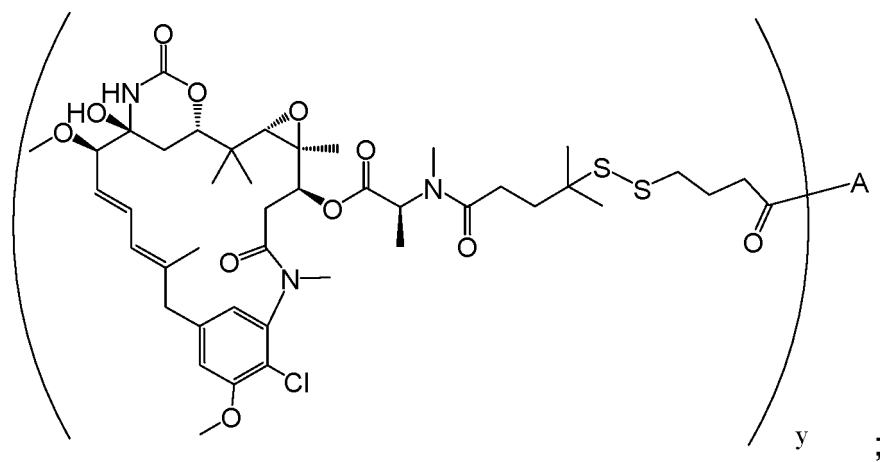
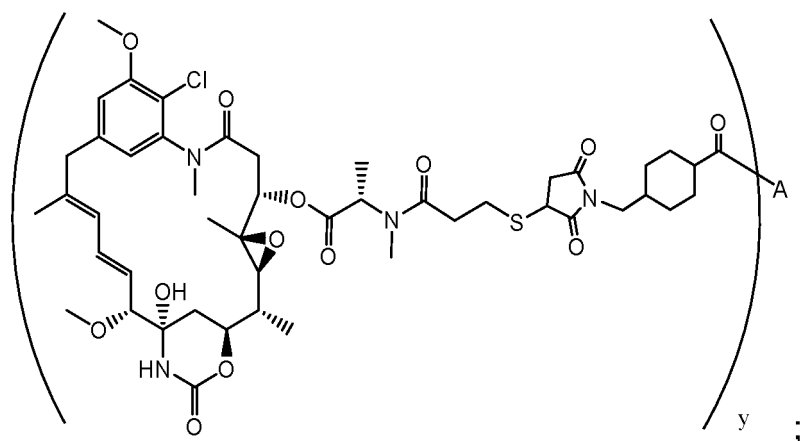


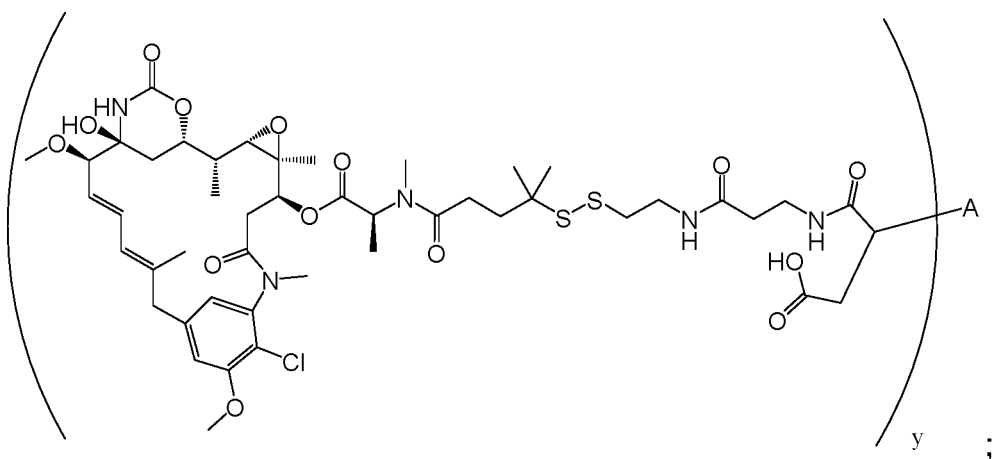
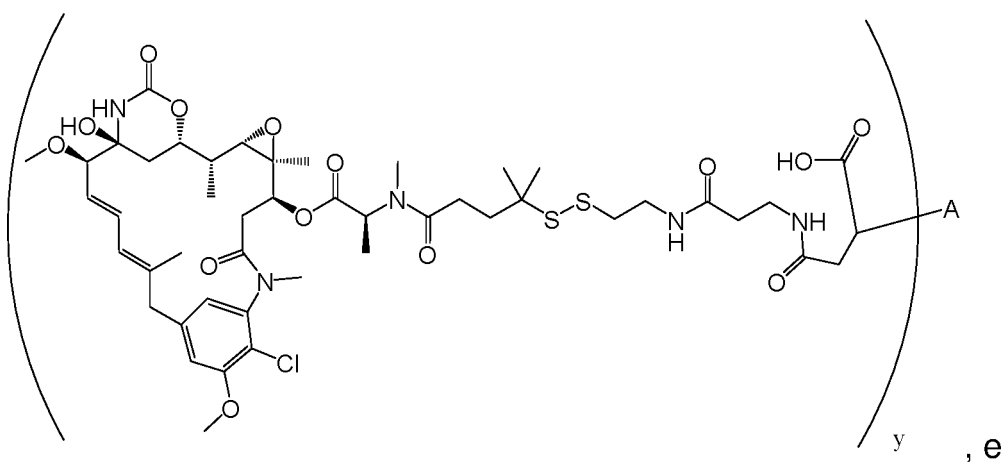
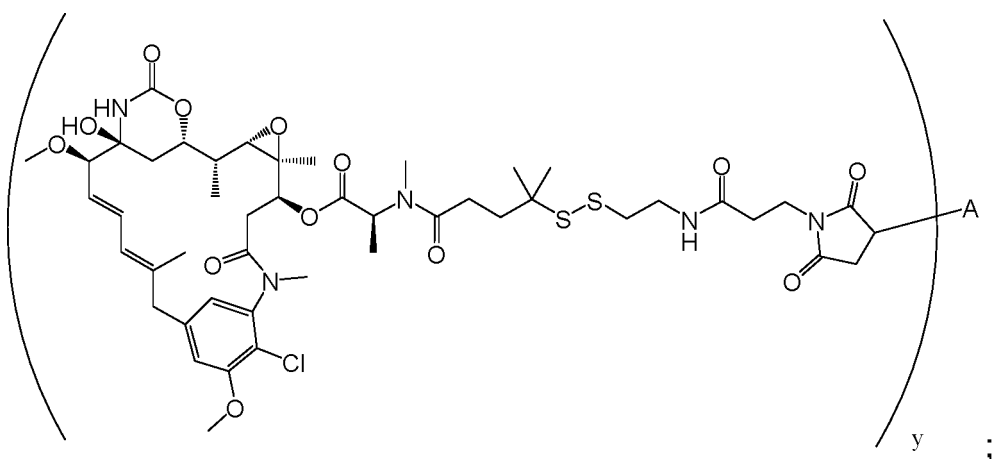
em que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano, e

y é um número inteiro de 1 a 10.

17. Conjugado, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:





em que:

A é um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano, e

y é um número inteiro de 1 a 10.

18. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo se liga especificamente ao domínio extracelular de cKIT humano

(SEQ ID NO: 112).

19. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo se liga especificamente a um epítopo nos domínios 1 a 3 de cKIT humano (SEQ ID NO: 113).

20. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um Fab ou Fab'.

21. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 ou 20, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é selecionado dentre qualquer um dos seguintes:

(1) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 1) de SEQ ID NO: 1, (b) uma HCDR2 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 2) de SEQ ID NO: 2, e (c) uma HCDR3 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 3) de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 1) de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 2) de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 3) de SEQ ID NO: 18;

(2) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 5, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21;

(3) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável

de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(4) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 8, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(5) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 27, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(6) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 30, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 31, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 44, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 45;

(7) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 32, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(8) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável

de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 33, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 34, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 35; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 46, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(9) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 1, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(10) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 52, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21;

(11) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 51, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(12) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 53, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(13) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variá-

vel de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 60, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(14) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 63, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 64, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 78, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 80;

(15) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 65, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(16) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 66, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 67, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 68; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 81, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(17) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 86, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(18) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável

vel de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 89, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 90, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 104, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 106;

(19) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 91, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(20) um Fab ou Fab' que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 92, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 93, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 94; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 107, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(21) um Fab ou Fab' que compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende SEQ ID NO: 10, e uma região variável de cadeia leve (VL) que compreende SEQ ID NO: 23;

(22) um Fab ou Fab' que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 36, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 47;

(23) um Fab ou Fab' que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 54, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 23;

(24) um Fab ou Fab' que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 69, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 82;

(25) um Fab ou Fab' que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 95, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 108;

(26) um Fab' que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 14, e uma cadeia leve que compreende SEQ

ID NO: 25;

(27) um Fab' que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 40, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 49;

(28) um Fab' que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 25;

(29) um Fab' que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 73, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 84;

(30) um Fab' que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 110;

(31) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 122;

(32) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 123;

(33) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 128;

(34) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 129;

(35) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 134;

(36) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende

SEQ ID NO: 135;

(37) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 136, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 140;

(38) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 141, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 145;

(39) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 119, 120 ou 121, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(40) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 125, 126, ou 127, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49;

(41) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 131, 132, ou 133, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(42) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 137, 138, ou 139, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 84; ou

(43) um Fab que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 142, 143, ou 144, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

22. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um Fab ou Fab' humano ou humanizado.

23. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um Fab' e o ligante (L_B) é fixado a um resíduo de cisteína nativa na região de dobradiça do Fab'.

24. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo compreende pelo menos uma cisteína não nativa introduzida em uma região constante, e o ligante (L_B) é fixado à cisteína não nativa.

25. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 11 ou 14 a 15, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um Fab' e L_{20} é fixado a um resíduo de cisteína nativa na região de dobradiça do Fab'.

26. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 ou 11 ou 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo compreende pelo menos uma cisteína não nativa introduzida em uma região constante, e L_{20} é fixado à cisteína não nativa.

27. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um Fab' e L_{30} é fixado a um resíduo de cisteína nativa na região de dobradiça do Fab'.

28. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo compreende pelo menos uma cisteína não nativa introduzida em uma região constante, e L_{30} é fixado à cisteína não nativa.

29. Conjugado, de acordo com a reivindicação 24, 26 ou 28, caracterizado pelo fato de que o fragmento de anticorpo compreende cisteína em um ou mais das seguintes posições (todas as posições por numeração de EU):

(a) posição 152 da cadeia pesada,

(b) posição 114 ou 165 da cadeia leve kappa, ou

(c) posição 143 da cadeia leve lambda.

30. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que a meia-vida do conjugado é menor do que cerca de 24 a 48 horas.

31. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que o conjugado não induz degranulação de mastócito.

32. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende o conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31 e um carreador farmacêuticamente aceitável.

33. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que compreende ainda outro agente terapêutico.

34. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que a composição é um liofilisato.

35. Método de ablação de células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz do conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 32 ou 33.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o paciente é um recipiente de transplante de célula-tronco hematopoiética.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o método é realizado antes de transplante de célula-tronco hematopoiética ao paciente.

38. Método de condicionamento de um paciente de transplante de célula-tronco hematopoiética, caracterizado pelo fato de que

o método compreende: administrar ao paciente uma quantidade eficaz do conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31, ou a composição farmacêutica como definida na reivindicação 32 ou 33, e permitir um período de tempo suficiente para que os conjugados sejam eliminados da circulação do paciente antes de realizar o transplante de célula-tronco hematopoiética ao paciente.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 38, caracterizado pelo fato de que o paciente tem uma doença imunodeficiente herdada, um distúrbio autoimune, um distúrbio hematopoiético, ou um erro congênito de metabolismo.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o distúrbio hematopoiético é selecionado dentre: Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia monocítica aguda (AMoL), leucemia mieloide crônica (CML), Leucemia linfocítica crônica (CLL), Distúrbios mieloproliferativos, síndromes Mielodisplásticas, Mieloma múltiplo, linfoma de Não-Hodgkin, doença de Hodgkin, Anemia aplástica, Aplasia de glóbulo vermelho puro, Hemoglobinuria noturna paroxismal, Anemia Fanconi, Talassemia major, Anemia de célula falciforme, Imunodeficiência combinada severa, síndrome de Wiskott-Aldrich, Linfo-histiocitose hemofagocítica.

41. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o erro congênito de metabolismo é selecionado dentre mucopolisacaridose, doença de Gaucher, leucodistrofias meta-cromáticas, ou adrenoleucodistrofias.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 38, caracterizado pelo fato de que o paciente tem uma doença ou afecção não maligna selecionada dentre Anemia aplástica severa (SAA), Síndrome de Wiskott Aldrich, Síndrome de Hurlers, FHL, CGD, síndrome de Kostmanns, Síndrome de imunodeficiência severa (SCID), outros distúrbios autoimunes tais como SLE, Esclerose múlti-

pla, IBD, Doença de Crohn, síndrome de Sjögrens, vasculite, Lúpus, Miastenia Gravis, doença de Wegeners, erros congênitos de metabolismo e/ou outras imunodeficiências.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 38, caracterizado pelo fato de que o paciente tem uma doença ou afecção maligna selecionada dentre síndromes mielodisplásticas (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia monocítica aguda (AMoL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mielógena crônica (CML), leucemia de célula cabeluda (HCL), leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande, leucemia de célula T adulta, Leucemia/linfoma de célula T precursora, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma de célula B difusa, linfoma de célula de manto, leucemia/linfoma linfocítica crônica de célula B, linfoma MALT, Micose fungoide, linfoma de célula T periférica não especificada de outro modo, forma de esclerose nodular de subtipo de celularidade misturada de linfoma Hodgkin.

44. Uso do conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que é para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas.

45. Uso do conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas.

46. Anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo é selecionado dentre qualquer um dos se-

guintes:

(1) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 1) de SEQ ID NO: 1, (b) uma HCDR2 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 2) de SEQ ID NO: 2, e (c) uma HCDR3 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Pesada 3) de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 1) de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 2) de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 (Região de Determinação de Complementaridade de Cadeia Leve 3) de SEQ ID NO: 18;

(2) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 5, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 19, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 21;

(3) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 6, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 2, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 3; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 16, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(4) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 7, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 8, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 9; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 22, (e) uma LCDR2 de

SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 18;

(5) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 27, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(6) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 30, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 31, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 44, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 45;

(7) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 32, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 28, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 29; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 42, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 17, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(8) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 33, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 34, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 35; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 46, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 20, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 43;

(9) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 60, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75, (e) uma

LCDR2 de SEQ ID NO: 76, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(10) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 63, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 64, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 78, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 80;

(11) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 65, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 61, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 62; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 75, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 76, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(12) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 66, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 67, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 68; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 81, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 79, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 77;

(13) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 86, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(14) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 89, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 90, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de ca-

deia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 104, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 106;

(15) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 91, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 87, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 88; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 101, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 102, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(16) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada que compreende (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 92, (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 93, (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 94; e (ii) uma região variável de cadeia leve que compreende: (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 107, (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 105, e (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 103;

(17) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende SEQ ID NO: 10, e uma região variável de cadeia leve (VL) que compreende SEQ ID NO: 23;

(18) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 36, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 47;

(19) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 69, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 82;

(20) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma VH que compreende SEQ ID NO: 95, e uma VL que compreende SEQ ID NO: 108;

(21) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 14, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 25;

(22) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 40, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 49;

(23) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 73, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 84;

(24) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 110;

(25) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 122;

(26) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 118, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 123;

(27) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 128;

(28) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 124, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 129;

(29) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 134;

(30) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 135;

(31) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 136, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 140;

(32) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 141, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 145;

(33) um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 12, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 25;

(34) um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 38, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 49;

(35) um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 71, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 84; ou

(36) um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 97, e uma cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 110.

47. Ácido nucleico caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo ou fragmento de anticorpo, como definido na reivindicação 46.

48. Vetor caracterizado pelo fato de que é compreende o ácido nucleico, como definido na reivindicação 47.

49. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, como definido na reivindicação 48.

50. Processo para produzir um anticorpo ou fragmento de anticorpo, caracterizado pelo fato de que o processo compreende cultivar a célula hospedeira, como definido na reivindicação 49, e recuperar o anticorpo ou fragmento de anticorpo da cultura.

FIG. 1

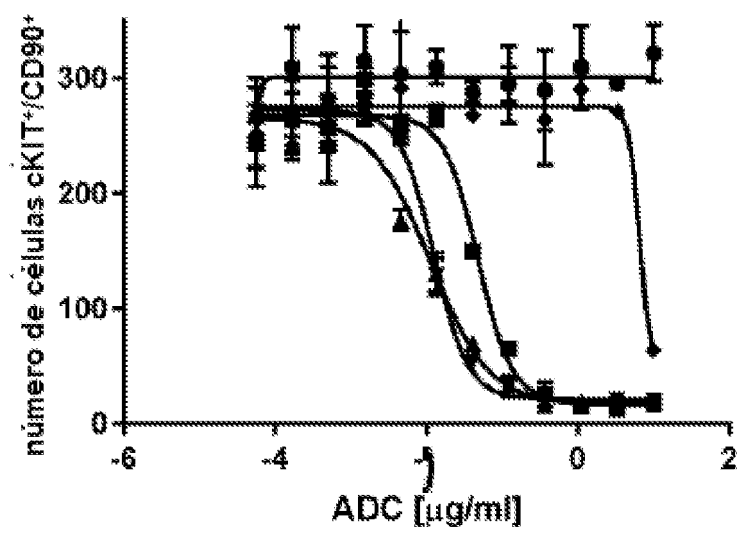


FIG. 2

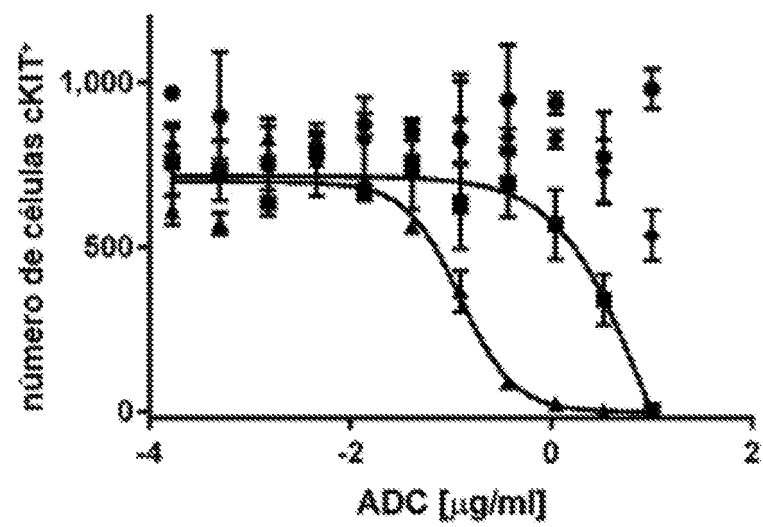


FIG. 3A

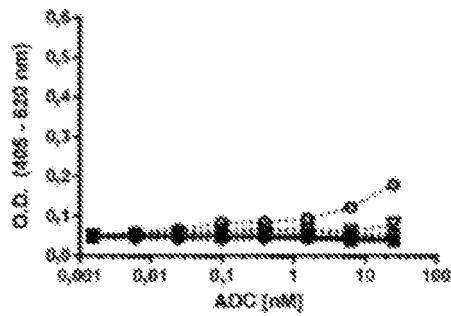


FIG. 3B

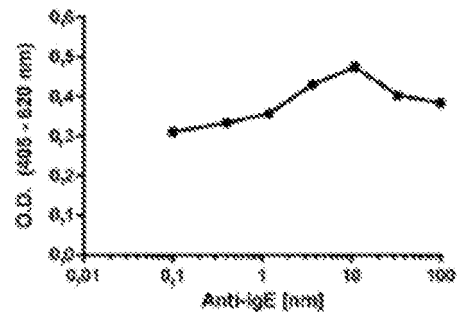


FIG. 3C

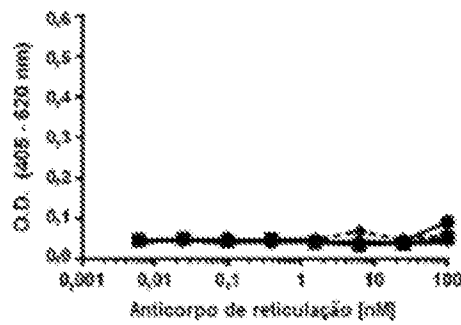


FIG. 3D

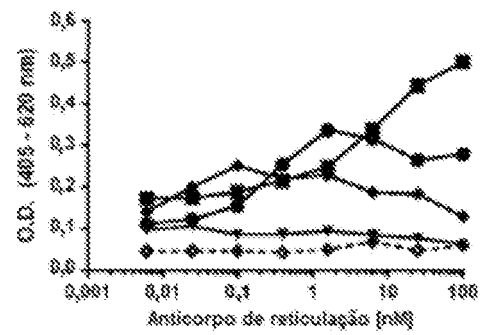


FIG. 3E

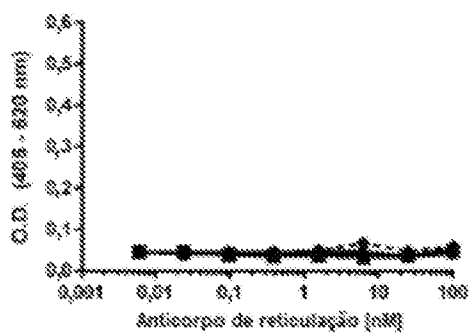


FIG. 3F

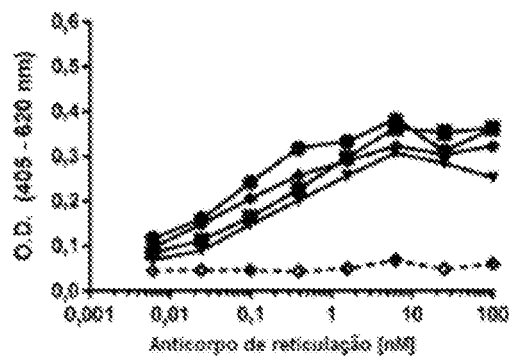


FIG. 3G

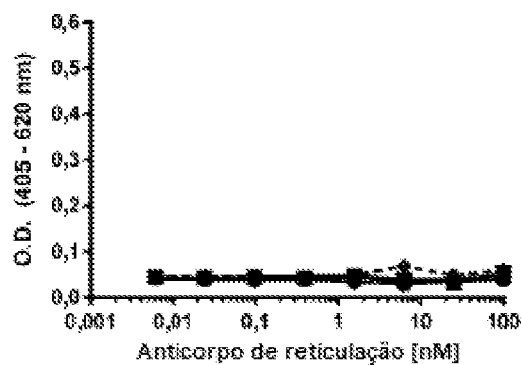


FIG. 3H

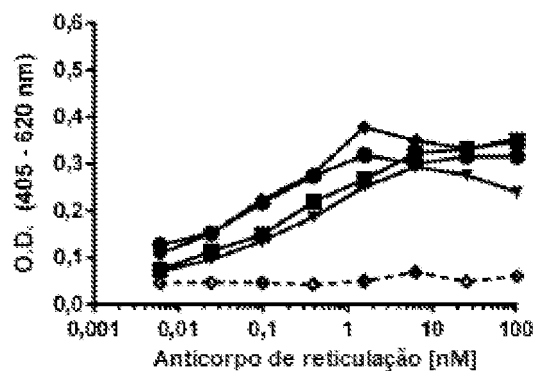


FIG. 3I

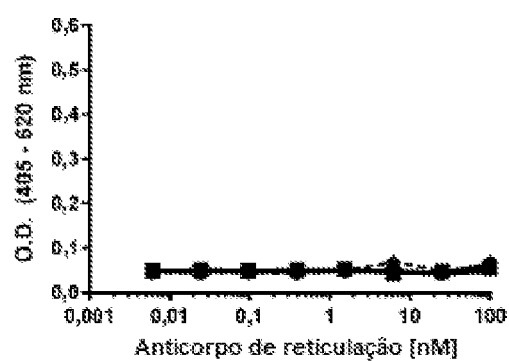


FIG. 3J

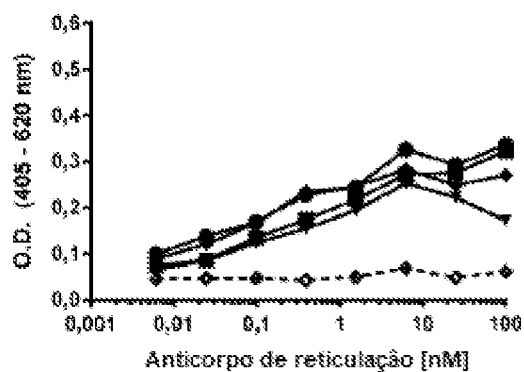


FIG. 3K

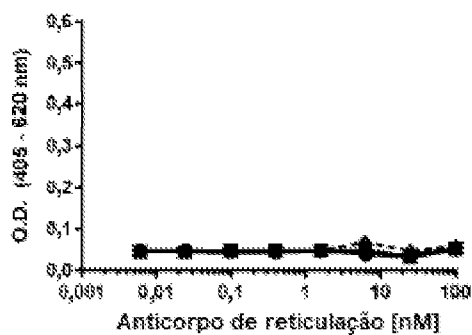


FIG. 3L

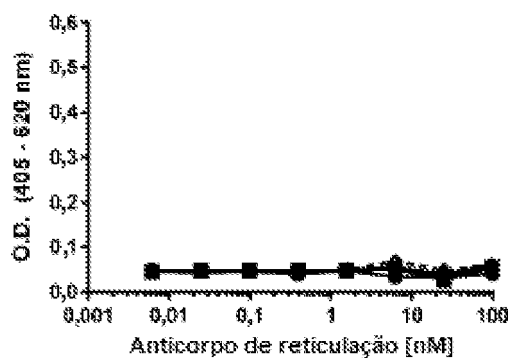


FIG. 4

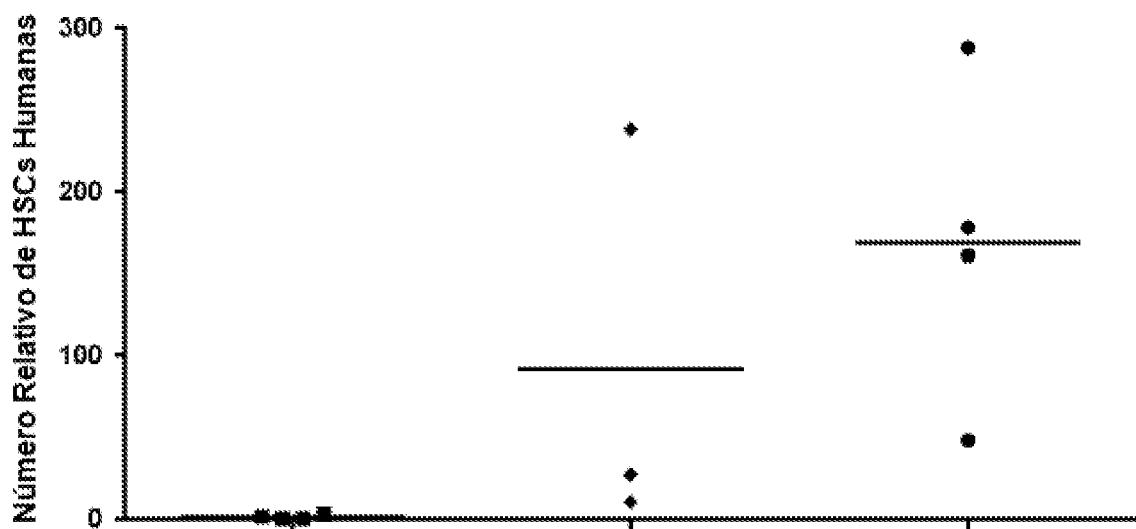


FIG. 5

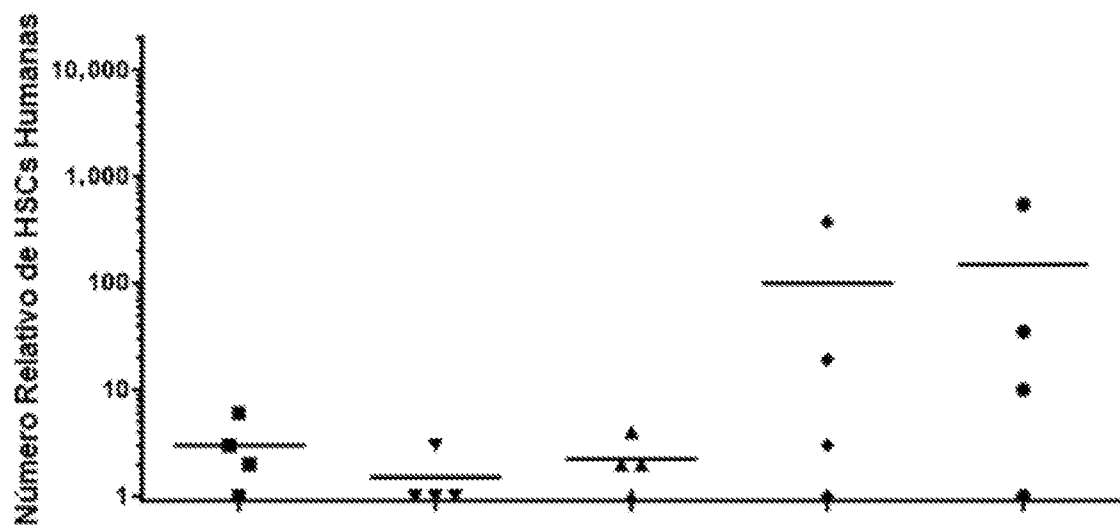
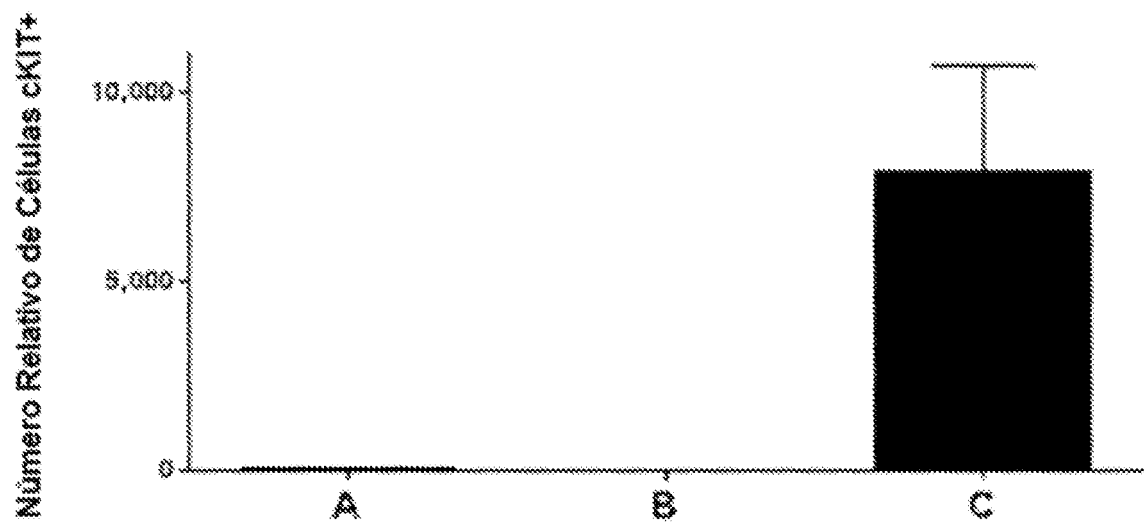
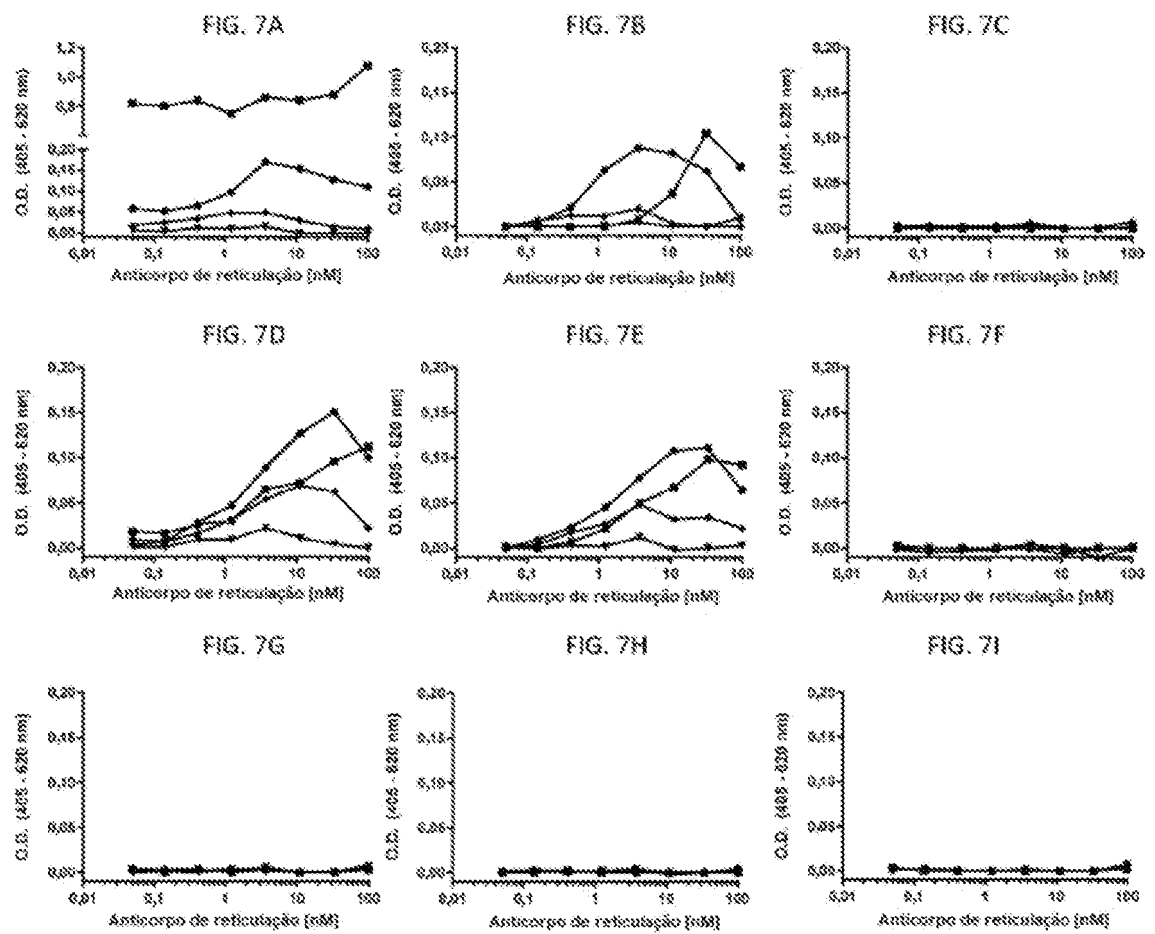


FIG. 6





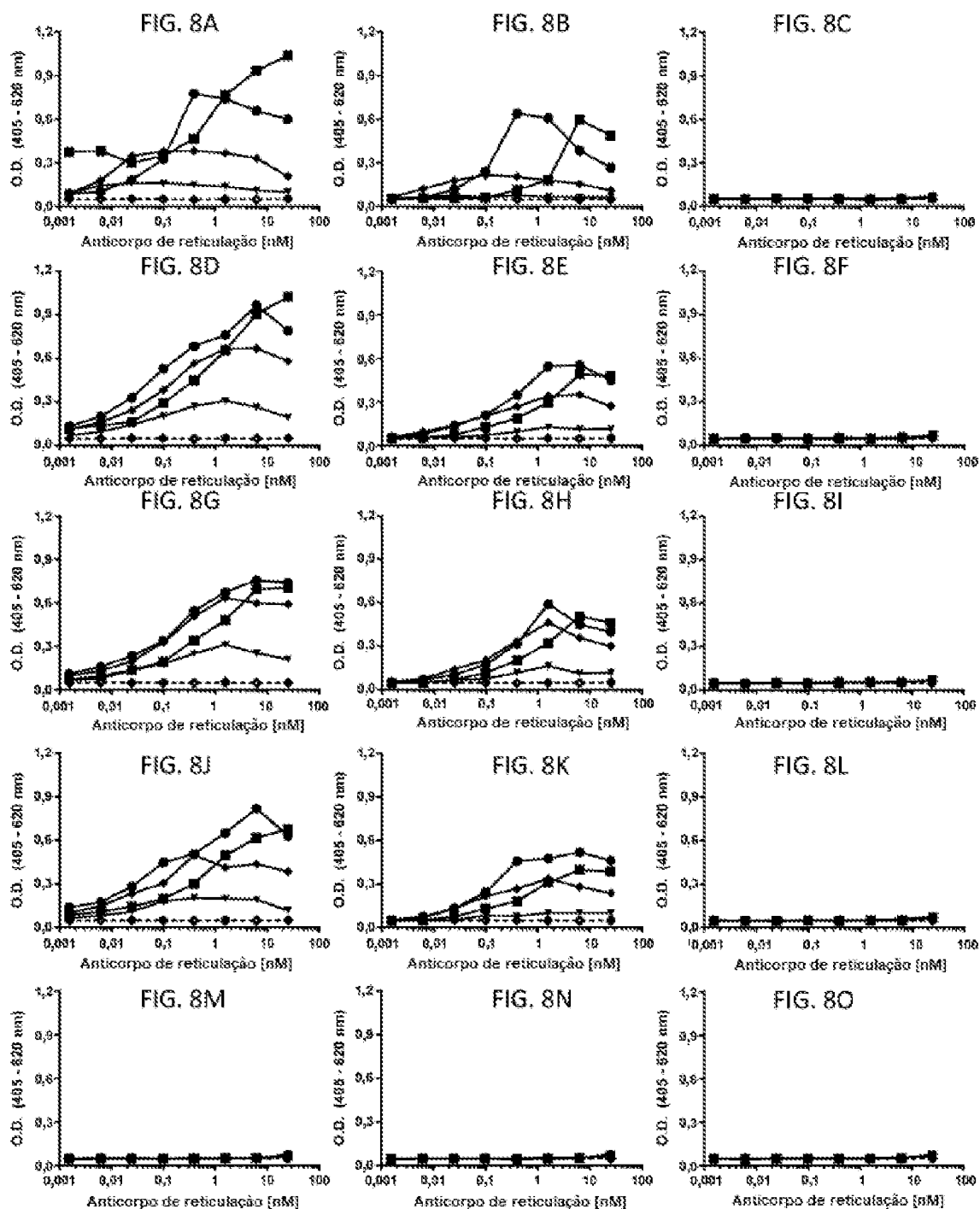


FIG. 9A

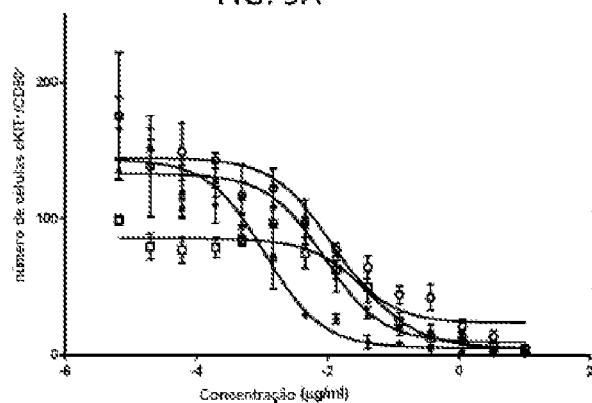


FIG. 9B

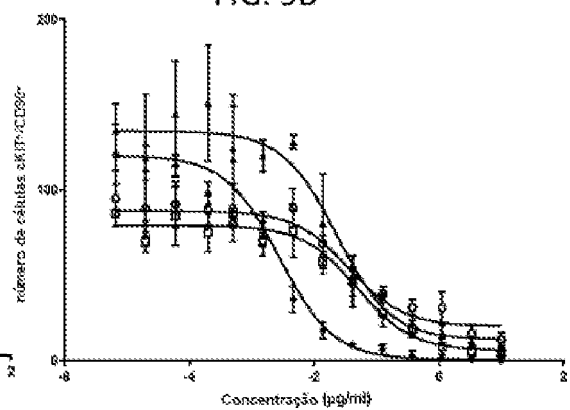
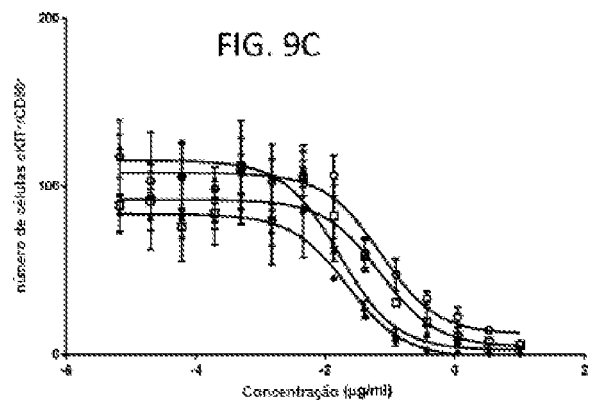


FIG. 9C



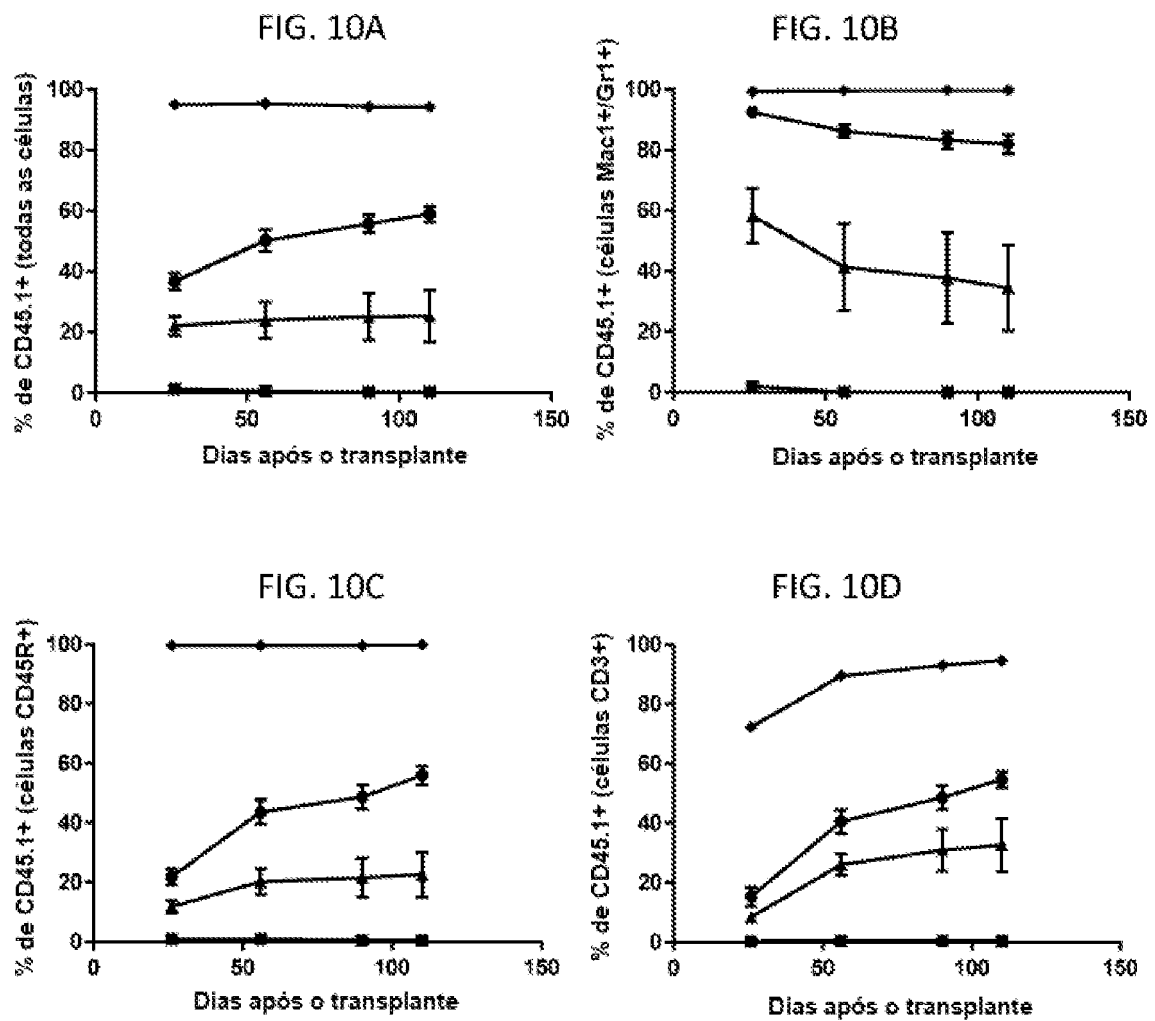


FIG. 11A

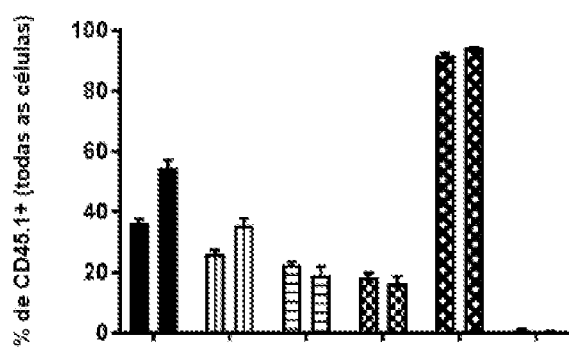


FIG. 11B

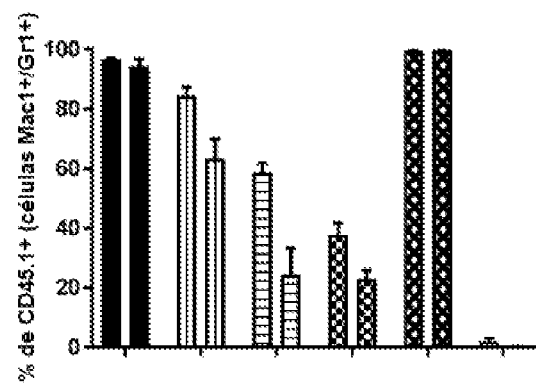


FIG. 12A

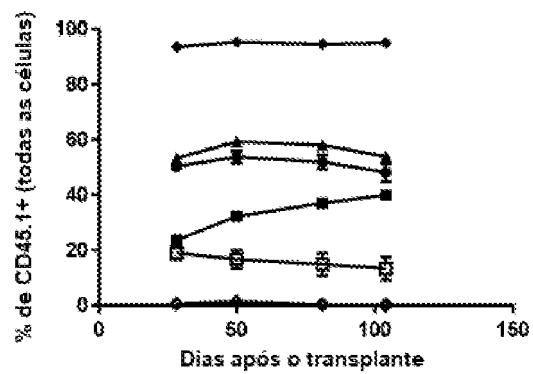


FIG. 12B

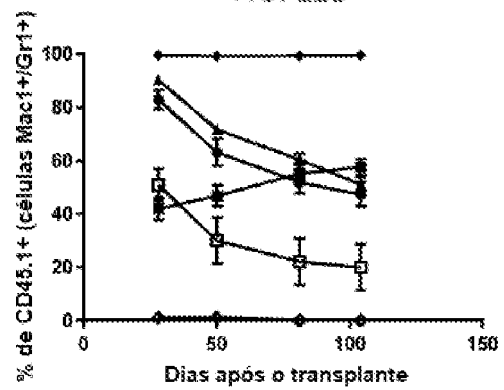
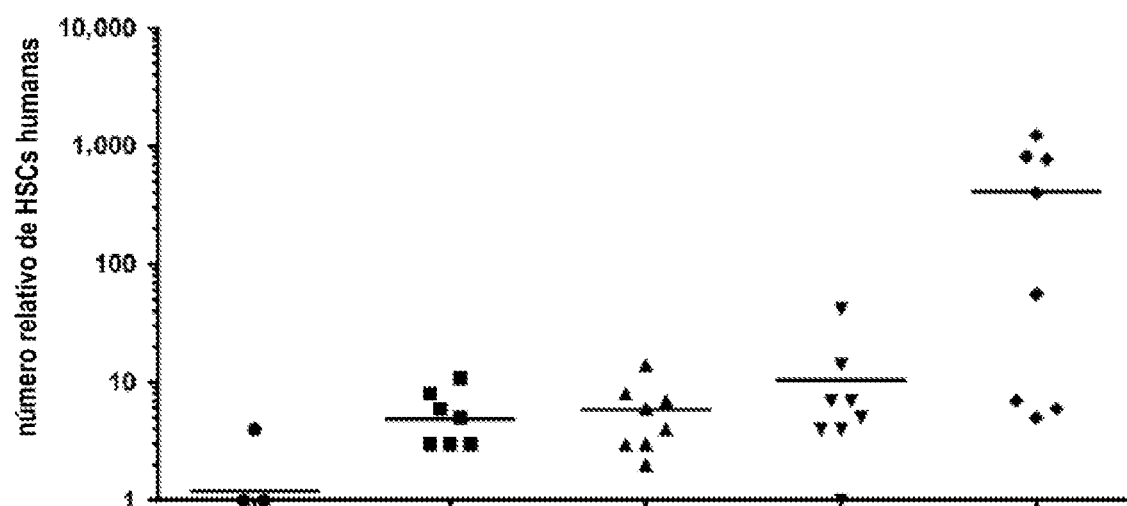


FIG. 13



RESUMO

Patente de Invenção: "**CONJUGADOS DE FÁRMACO DE ANTICORPO PARA ABLAR CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**".

A presente invenção fornece conjugados de fármaco de anticorpo, em que um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a cKIT humano é ligado a uma porção química de fármaco, opcionalmente através de um ligante. A presente invenção fornece ainda composições farmacêuticas que compreendem os conjugados de fármaco de anticorpo; e métodos de produção e uso de tais composições farmacêuticas para ablar células-tronco hematopoiéticas em um paciente que necessita das mesmas.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P240608 ListSeq (JUNTADA TRADUÇÃO).txt
- Data de Geração do Código: 19/07/2019
- Hora de Geração do Código: 09:43:02
- Código de Controle:
 - Campo 1: A58704C57F096C17
 - Campo 2: D62CC4B556F37E72