



República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0809351-2 A2



* B R P I 0 8 0 9 3 5 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 26/03/2008
(43) Data da Publicação: 02/09/2014
(RPI 2278)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/28
A61P 35/00

(54) Título: ANTICORPO DE ANTI CD166 HUMANO
LIGANDO CÉLULAS TUMORAIS HUMANO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 26/03/2007 GB 07 05775.5,
26/03/2007 US 60/907,241

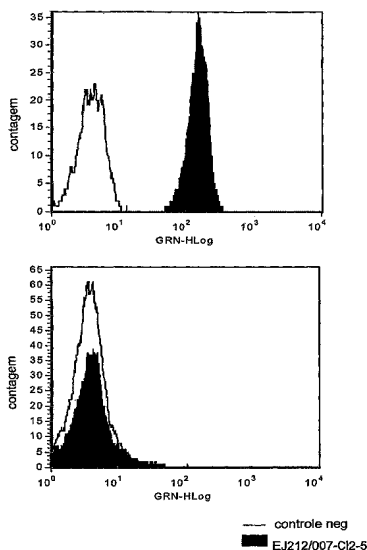
(73) Titular(es): Affitech Research AS

(72) Inventor(es): Marike Stassar

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT GB2008001045 de
26/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/117049de
02/10/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPO DE ANTI CD166 HUMANO LIGANDO CÉLULAS TUMORAIS HUMANO".

A presente invenção refere-se à proteínas de ligação tumor-específicas e todos os usos das mesmas. Em particular, a invenção refere-se a anticorpos ou fragmentos de anticorpo específicos para antígenos ou moléculas sobre células cancerígenas e a métodos de uso dos mesmos. De preferência, o antígeno é CD166.

Nos anos 2000, estima-se que 22 milhões de pessoas sofreram de câncer no mundo todo e 6,2 milhões de mortes foram atribuídas a essa classe de doenças. A cada ano, surgem mais de 10 milhões de novos casos e espera-se que essa estimativa cresça para 50% durante os próximos 15 anos (OMS, World Cancer Report. Bernard W. Stewart e Paul Kleihues, eds. IARC Press, Lyon, 2003).

O carcinoma de mama é um carcinoma do tecido da mama. No mundo todo, ele é a forma mais comum de câncer em mulheres, afetando aproximadamente 10% de todas as mulheres em algum estágio de sua vida (no mundo Ocidental). Embora esforços significativos tenham sido feitos para obter detecção precoce e tratamento eficaz, cerca de 20% de todas as mulheres com câncer de mama ainda morrem da doença. O carcinoma de mama é a segunda causa mais comum de mortes por câncer em mulheres.

Os tratamentos atuais para o câncer estão limitados à cirurgia invasiva, terapia de radiação e quimioterapia, todos os quais causam efeitos colaterais potencialmente graves, toxicidade não-específica e/ou alterações traumatizantes em sua imagem corporal e/ou qualidade de vida. O câncer pode se tornar resistente à quimioterapia, reduzindo ainda mais as opções de tratamento e probabilidade de sucesso. Alguns cânceres com uma taxa de sucesso de tratamento relativamente alta, tal como câncer de mama, também têm uma taxa de incidência muito alta e, assim, continuam sendo grandes assassinos.

Por exemplo, de acordo com a OMS surgem mais de 1,2 milhões de novos casos de câncer de mama mundialmente a cada ano. A base do tratamento de câncer de mama é a cirurgia (lumpectomia e mastectomia)

quando o tumor é localizado, com possível terapia hormonal adjuvante (clássicamente com tamoxifeno ou inibidores de aromatase). Quimioterapia e radioterapia são usadas, seja para dar suporte à cirurgia ou em casos de doença disseminada. Recentemente, o uso do anticorpo monoclonal humanizado HER-2/neu-específico Herceptina mostrou resultados muito promissores.

Existem vários fatores prognósticos associados ao câncer de mama. O estágio é o único fator prognóstico mais importante em câncer de mama, uma vez que ele leva em consideração o envolvimento local, estado no nódulo linfático e a presença de metástases. Quanto maior o estágio no momento de diagnóstico, pior o prognóstico. A presença de receptores de estrogênio e progesterona na célula cancerígena é outro fator prognóstico clássico importante. Além disso, o câncer de mama positivo para o receptor hormonal usualmente está associado a um prognóstico muito melhor comparado com o câncer de mama negativo para hormônios. Também, mais recentemente, o estado de HER-2/neu foi descrito como um fator prognóstico. O prognóstico para doença localizada é relativamente bom, com uma taxa de sobrevivência de 5 anos em torno de 50% mas, uma vez que o câncer tenha sofrido metástase, ele é incurável, com uma sobrevivência média em torno de 2 anos. Apesar das taxas de tratamento aprimoradas, quase 400.000 mulheres morrem de câncer de mama a cada ano, o maior número de mortes por câncer em mulheres, na frente das mortes por câncer de pulmão. Dentre os sobreviventes a curto e longo prazo, a maioria sofrerá trauma ao longo da vida pelo tratamento cirúrgico invasivo e desfigurante.

Existem muitos outros exemplos de câncer onde os tratamentos atuais não vão de encontro às necessidades dos pacientes em virtude de sua falta de eficácia e/ou porque eles têm altas taxas de morbidade e graves efeitos colaterais. Aquelas estatísticas e fatos selecionados, contudo, ilustram bem a necessidade de tratamentos para o câncer com melhores perfis de segurança e eficácia.

Uma das causas para a inadequabilidade dos tratamentos atuais para o câncer é sua falta de seletividade pelos tecidos e células afetados. A

ressecção cirúrgica sempre envolve a remoção de tecido aparentemente normal como uma "margem de segurança", o que aumenta a morbidade e o risco de complicações. Ela também sempre remove um pouco do tecido saudável que pode estar interposto com as células tumorais e que poderia
5 manter ou restaurar potencialmente a função do órgão ou tecido afetado. Radiação e quimioterapia matarão ou danificarão muitas células normais em virtude de seu modo de ação não-específico. Isso pode resultar em graves efeitos colaterais, tais como náusea grave, perda de peso e estamina reduzida, perda de cabelo, etc., bem como aumento do risco de desenvolver
10 câncer secundário posteriormente na vida. O tratamento com maior seletividade pelas células cancerígenas deixaria as células normais ilesas, assim, melhorando os resultados, perfil de efeitos colaterais e qualidade de vida.

A seletividade do tratamento de câncer pode ser melhorada usando anticorpos que são específicos para moléculas presentes apenas ou
15 principalmente sobre células cancerígenas ou as quais estão presentes em maiores níveis sobre células cancerígenas ou superexpressas em células cancerígenas. Tais anticorpos podem ser usados para modular o sistema imune e intensificar o reconhecimento e destruição do câncer pelo sistema imune do próprio paciente. A maioria dos anticorpos testados até o momento
20 tem sido estimulados contra marcadores de câncer conhecidos na forma de anticorpos monoclonais de camundongo, algumas vezes "humanizados" através de engenharia molecular. Infelizmente, seus alvos também podem estar presentes em quantidades significativas sobre um subconjunto de células normais, assim, elevando o risco de efeitos tóxicos não-específicos.
25 Além disso, esses anticorpos são proteínas de camundongo que são encarradas pelo sistema imune do paciente como proteínas estranhas. A subsequente reação imune e a resposta de anticorpo podem resultar em uma perda de eficácia ou em efeitos colaterais.

Os inventores usaram uma abordagem diferente em seu desenvolvimento de anticorpos para o tratamento de câncer, em particular trata-
30 mento de câncer de mama. Ao invés de imunização de animais experimentais com células cancerígenas ou marcadores isolados de células cancerí-

genas, eles consideraram identificar apenas aqueles marcadores que são reconhecidos pelo sistema imune humano como suficientemente estranhos para permitir que anticorpos específicos contra os mesmos fossem descobertos. Isso implica no fato de que os marcadores ou antígenos são menos abundantes ou estão ausentes sobre células normais e, assim, o risco de toxicidade não-específica é adicionalmente reduzido. Assim, anticorpos mostrando alta seletividade por células cancerígenas/células tumorais, em particular células de câncer de mama, com relação a células normais foram identificados. Tais anticorpos seletivos são o assunto do presente pedido de patente. Além de serem seletivos, de preferência, tais anticorpos são totalmente compatíveis com o sistema imune do paciente por serem proteínas totalmente humanas. Os anticorpos da invenção podem ser usados para usos diagnósticos ou terapêuticos (em particular para câncer, especialmente câncer de mama) ou como uma base para a manipulação de outras moléculas de ligação para o antígeno-alvo. Os anticorpos também podem ser usados para isolar e identificar a molécula à qual eles se ligam. O papel do antígeno em câncer pode, então, ser estudado ou o antígeno pode ser usado para desenvolver outros tratamentos para o câncer. Os inventores determinaram a identidade do antígeno ao qual os anticorpos da invenção se ligam.

O antígeno é CD166, também conhecido como ALCAM (molécula de adesão à célula leucocitária ativado), MEMD, SB-10, KG-CAM e neurolina. CD166 é uma glicoproteína na transmembrana de 105 kDa a qual é um membro da superfamília de imunoglobulina com cinco domínios similares à imunoglobulina extracelulares. Ela tem uma cauda citoplásmica curta e sua parte extracelular compreende cinco domínios de Ig: dois domínios de Ig do tipo variável (V) amino-terminais seguido por três domínios de Ig do tipo constante (C) ($V_1V_2C_1C_2C_3$). Um epítipo preferido dos anticorpos da invenção está localizado sobre o domínio extracelular do antígeno CD166.

Assim, a CD166 é uma proteína na superfície celular. Ela pode ser encontrada sobre leucócitos ativados, fibroblastos tímicos corticais e medulares, alguns subconjuntos de células neurais e algumas células epiteliais. Como uma regra geral, a ALCAM é, frequentemente, encontrada em

células em migração e/ou em crescimento dinâmico.

A CD166 foi primeiro identificada como um ligante de CD6, mas ela também media interações hemofílicas com a CD166. Ela é expressa no desenvolvimento em células de todas as linhagens embriônicas, mas acredita-se que sua expressão esteja limitada a subconjuntos de células na maioria dos tecidos em adultos. Acredita-se que a CD166 esteja localizada em junções intercelulares no epitélio e isso pode ser como parte do complexo adesivo que mantém a arquitetura tecidual. A CD166 foi relacionada à migração celular, desenvolvimento de câncer e progressão e metástase de câncer. Expressão anormal de CD166 foi implicada em vários tumores humanos, incluindo melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ovariano, câncer de pâncreas, câncer de pulmão e carcinoma de células escamosas esofageais.

Os presentes inventores prepararam anticorpos tumor-específicos humanos que se ligam a células cancerígenas, em particular células de tumor de mama. De modo importante, os anticorpos não se ligam significativamente à células normais, tornando os mesmos candidatos adequados para diagnóstico e terapia de tumor, de preferência terapia de câncer de mama. Outros cânceres preferidos são descritos em alguma parte aqui.

Os inventores clonaram e sequenciaram os anticorpos e determinaram a sequência das regiões variáveis de cadeias leve e pesada de anticorpo, incluindo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3.

Consequentemente, a presente invenção proporciona proteínas de ligação tumor-específicas, por exemplo, moléculas de anticorpo. Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona proteínas de ligação humanas, por exemplo, moléculas de anticorpo, com essas propriedades.

O termo "células normais" é usado aqui para se referir a células não-cancerígenas. Esse termo abrange células saudáveis as quais ocorrem naturalmente dentro do corpo humano, em particular células vermelhas de sangue periférico ou granulócitos. Assim, de preferência, a proteína de ligação não se liga significativamente a linfócitos sanguíneos periféricos (PBLs)

e/ou não se liga significativamente a granulócitos. Em uma modalidade preferida, a proteína de ligação mostra uma ligação mensurável ou significativa à linhagem de câncer de mama MDA-MB 231, mas mostra ligação insignificante ou não mensurável a granulócitos ou linfócitos de sangue periférico (PBLs).

O termo "não se ligam significativamente a células normais" deverá ser entendido de modo que qualquer ligação da proteína de ligação a células normais não impede o uso da referida proteína de ligação para fins terapêuticos ou diagnósticos. Assim, por ligação "insignificante" a células normais entenda-se, de preferência, que a ligação da proteína de ligação a células normais é mais fraca do que sua ligação a uma ou mais células tumorais. Para fins terapêuticos, a principal consideração é que a proteína de ligação deva se ligar mais fortemente a um ou mais tipos de células tumorais do que a quaisquer células saudáveis (ou uma ou mais células saudáveis correspondentes) com as quais a proteína de ligação possa entrar em contato durante a aplicação terapêutica ou que qualquer ligação a células normais e os efeitos potencialmente negativos causados por essa ligação sejam superados pelos efeitos positivos no tratamento de câncer obtido pela ligação do anticorpo às células cancerígenas.

Para fins diagnósticos, a principal consideração é que a ligação da proteína de ligação (de preferência anticorpo) às células tumorais gere um sinal claro o bastante para permitir um diagnóstico do câncer.

O termo "tumor-específico" deverá ser interpretado de modo que a ligação da proteína de ligação às células tumorais seja específica o bastante para permitir o uso da referida proteína de ligação para fins terapêuticos ou diagnósticos. Aqueles versados na técnica podem determinar facilmente se qualquer dada proteína de ligação é tumor-específica comparando a resistência de ligação à célula tumoral-alvo com a resistência de ligação a um ou mais tipos de células normais, por exemplo, células vermelhas de sangue periférico ou granulócitos. Qualquer referência aqui a um "tumor" ou "câncer" deverá ser entendida como incluindo uma referência a "tumores de mama" e "câncer de mama", a "tumor de próstata" e "câncer de próstata", a

"tumor ovariano" e "câncer ovariano", a "tumor de cólon" e "câncer de cólon", a "tumor de pulmão" e "câncer de pulmão", a "tumor de rim" e "câncer de rim" e/ou a "tumor de cérebro" e "câncer de cérebro", de preferência a "tumores de mama" e "câncer de mama".

5 As proteínas de ligação da invenção são tumor-específicas pelo fato de que as proteínas de ligação se ligam a um ou mais tipos de células tumorais, de preferência células de câncer de mama, mas a ligação a um ou mais tipos de células normais é insignificante ou não impede aplicações diagnósticas ou terapêuticas. Por exemplo, a proteína de ligação pode se ligar
10 a tecido normal o qual nunca entrará em contato com as proteínas de ligação da invenção, por exemplo, tecido normal no cérebro, o qual as proteínas de ligação não atingem se elas não são administradas ao cérebro porque elas não podem atravessar a barreira sangue/cérebro. Em algumas modalidades, a proteína de ligação também pode mostrar ligação significativa a
15 alguns tipos de células normais, isto é, saudáveis, as quais não são essenciais ou não existem no paciente a ser tratado (tais como células de próstata no caso de mulheres ou tratamento de homens com relação à metástase de câncer de próstata após remoção do órgão) e/ou as quais podem ser regeneradas rapidamente (tais como células epiteliais no intestino), mas a ligação
20 a outros tipos de células normais é insignificante. Nessas modalidades, as proteínas de ligação podem ser usadas para aplicações terapêuticas porque as proteínas de ligação se ligam a células tumorais e a maioria ou todas as células normais essenciais não são substancialmente afetadas pela proteína de ligação.

25 De preferência, as proteínas de ligação se ligam a um ou mais tipos de células tumorais, de preferência células de câncer de mama, de uma forma ou em um nível que é eficaz para fins diagnósticos ou terapêuticos (por exemplo, mostram ligação significativa e mensurável a um ou mais tipos de células tumorais, de preferência células de câncer de mama).

30 De preferência, as proteínas de ligação têm uma afinidade de ligação por um ou mais tipos de células cancerígenas a qual corresponde a uma K_m de menos de 1 μM , mais preferivelmente de menos de 500, 400 ou

300 nM, ainda mais preferivelmente de menos de 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 ou 100 nM, mais preferivelmente de menos de 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ou 1 nM. Por exemplo, a afinidade de ligação pode ser de $1,7 \times 10^{-7}$ M ou menos ou 3×10^{-8} M ou menos ou $2,9 \times 10^{-8}$ M ou menos ou $2,1 \times 10^{-8}$ M ou menos ou 1×10^{-8} M ou menos. As afinidades de ligação também podem ser referidas em termos da K_d , caso no qual valores similares são apropriados. As afinidades de ligação podem ser medidas usando qualquer formato apropriado de proteína de ligação da invenção. Onde as proteínas de ligação são anticorpos ou fragmentos de anticorpo, formatos preferidos são anticorpos inteiros (por exemplo, IgG), scFv ou Fab. Qualquer método apropriado de determinação da K_m ou K_d pode ser usado. Contudo, de preferência, a K_m ou K_d é determinada através de testagem de várias concentrações da proteína de ligação contra um número fixo de células-alvo (ou antígeno-alvo) *in vitro* para estabelecer uma curva de saturação, por exemplo, usando o método de Lineweaver-Burk ou um aparelho BiaCore e um software apropriado, tal como o modelo de ligação a 1:1 no software BiaCore 3000 Evaluation. Ensaaios adequados são descritos no Exemplo 3 para fins ilustrativos.

As proteínas de ligação têm, de preferência, uma K_m ou K_d por um ou mais tipos de células tumorais a qual é pelo menos 50% menos, mais preferivelmente pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 ordens de magnitude menor do que a K_m ou K_d para um ou mais tipos de células não-cancerígenas ou normais, por exemplo, células de PBL ou granulócitos, quando a afinidade de ligação é ensaiada sob condições comparáveis, em particular usando a mesma dosagem de proteína de ligação e células em cada ensaio.

As proteínas de ligação da presente invenção podem, de preferência, se ligar à CD166 ou fragmentos de CD166, em particular fragmentos compreendendo ou consistindo nos domínios extracelulares de CD166 ou entidades compreendendo CD166 ou fragmentos de CD166 ou podem inibir ou reduzir significativamente a função de CD166 ou impedir a interação de CD166 com seus ligantes naturais. A presente invenção, assim, ainda proporciona proteínas de ligação, por exemplo, moléculas de anticorpo, que

podem atuar como moduladores de CD6 ou CD166. Tais moduladores poderiam ser antagonistas. Alternativamente, a presente invenção pode ainda proporcionar proteínas de ligação, por exemplo, moléculas de anticorpo, que podem atuar como agonistas de CD6 ou CD166.

5 Proteínas de ligação preferidas da invenção podem se ligar à CD166 humana (ou fragmentos da mesma) e, de preferência, também à CD166 de murino (ou fragmentos da mesma). Afinidades de ligação exemplificativas e preferidas dos anticorpos da invenção à CD166 são conforme descrito para as afinidades de ligação a células tumorais.

10 Sequências de aminoácido e/ou DNA de moléculas de anticorpo as quais podem se ligar especificamente a células tumorais, de preferência células de câncer de mama e as quais podem, de preferência, se ligar à CD166, seus domínios V_H e V_L , incluindo regiões de determinação de complementaridade (CDRs) são apresentadas nas várias SEQ ID NOs. listadas aqui.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo um domínio CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 5 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

20 Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação compreende um domínio CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

25 Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação compreende um domínio CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 3 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

30 Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação compreende um domínio CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 6 ou uma sequência substancialmente homóloga à referida sequência.

Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação compre-

ende um domínio CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 7 ou uma sequência substancialmente homóloga à referida sequência.

5 Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação compreende um domínio CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 8 ou uma sequência substancialmente homóloga à referida sequência.

Assim, a proteína de ligação da presente invenção pode compreender qualquer uma ou mais do seguinte em qualquer combinação: uma
10 CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 3; uma CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 4; uma CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 5; uma CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 6; uma
15 CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 7; e/ou uma CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 8 ou uma sequência substancialmente homóloga a qualquer uma das SEQ ID Nos. precedentes.

De preferência, a proteína de ligação compreende uma CDR3 de
20 cadeia pesada conforme definido acima e uma CDR3 de cadeia leve conforme definido acima. Mais preferivelmente, um ou mais dos domínios de CDR1 e CDR2 definidos acima também estão presentes.

Em uma modalidade preferida, a CDR1 de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 3 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma, CDR2 compreendendo a
25 sequência de aminoácido de SEQ ID No: 4 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 5 ou uma sequência substancialmente homóloga a qualquer uma das SEQ ID Nos precedentes estão presentes individualmente
30 ou em combinação.

Em outra modalidade preferida, a CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 6 ou uma sequência

substancialmente homóloga à mesma, CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 7 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No: 8 ou uma sequência substancialmente homóloga a qualquer uma das SEQ ID Nos precedentes estão presentes individualmente ou em combinação.

Vista alternativamente, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo um domínio CDR3 de cadeia pesada e/ou um domínio CDR3 de cadeia leve conforme definido acima. A referida proteína de ligação ainda compreende, opcionalmente, um domínio CDR2 de cadeia pesada e/ou um domínio CDR2 de cadeia leve conforme definido acima e/ou ainda compreende um domínio CDR1 de cadeia pesada e/ou a um domínio CDR1 de cadeia leve conforme definido acima.

Vista ainda alternativamente, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo um domínio CDR1 de cadeia pesada e/ou a um domínio CDR1 de cadeia leve conforme definido acima. A referida proteína de ligação ainda compreende, opcionalmente, um domínio CDR3 de cadeia pesada e/ou um domínio CDR3 de cadeia leve conforme definido acima e/ou ainda compreende um domínio CDR2 de cadeia pesada e/ou um domínio CDR2 de cadeia leve conforme definido acima.

Vista ainda alternativamente, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo um domínio CDR2 de cadeia pesada e/ou a um domínio CDR1 de cadeia leve conforme definido acima. A referida proteína de ligação ainda compreende, opcionalmente, um domínio CDR3 de cadeia pesada e/ou um domínio CDR3 de cadeia leve conforme definido acima e/ou ainda compreende um domínio CDR1 de cadeia pesada e/ou a um domínio CDR1 de cadeia leve conforme definido acima.

Ainda uma modalidade da invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo uma ou mais das CDRs da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas, conforme apresentado aqui. Proteínas de ligação preferidas compreendem uma ou mais das CDRs selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NOs. 3, 4, 5, 6, 7 e 8 ou uma se-

quência substancialmente homóloga a qualquer uma das SEQ ID Nos. precedentes.

Assim, em modalidades preferidas, a proteína de ligação compreende uma CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido RASQDISSYFA (SEQ ID NO: 6) ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e/ou compreende uma CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido AASTLRS (SEQ ID NO:7) ou sequências substancialmente homólogas à mesma; ou compreende uma CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido QQSYSTPRIT (SEQ ID NO: 8) ou sequências substancialmente homólogas à mesma.

Proteínas de ligação preferidas compreendem duas ou mais das CDRs de cadeia leve da ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima. Moléculas de ligação especialmente preferidas compreendem 3 das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima (isto é, uma de cada uma das CDR1 e CDR2 e CDR3 de cadeia leve).

Outras proteínas de ligação preferidas compreendem duas ou mais das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima. Moléculas de ligação especialmente preferidas compreendem 3 das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima (isto é, uma de cada uma das CDR1 e CDR2 e CDR3 de cadeia pesada). Proteínas de ligação mais preferidas compreendem 3 das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima e 3 das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima.

Moléculas de ligação especialmente preferidas compreendem um domínio CDR1 de cadeia pesada de SEQ ID NO: 3, um domínio CDR2 de cadeia pesada de SEQ ID NO: 4 e um domínio CDR3 de cadeia pesada de SEQ ID NO: 5 ou sequências substancialmente homólogas às mesmas; e/ou compreendem a um domínio CDR1 de cadeia leve de SEQ ID NO: 6,

um domínio CDR2 de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e um domínio CDR3 de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 ou sequências substancialmente homólogas às mesmas.

5 Outras modalidades preferidas proporcionam proteínas de ligação compreendendo um domínio V_H o qual compreende uma ou mais das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas, conforme descrito acima e/ou um domínio V_L o qual compreende uma ou mais das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas, conforme descrito acima.

10 Regiões variáveis (domínios V_L) de cadeia leve preferidas compreendem 2 ou mais das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas, conforme descrito acima. Domínios V_L especialmente preferidos compreendem 3 das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima (isto é, uma de cada uma da CDR1, CDR2 e CDR3).
 15 Regiões variáveis (domínios V_H) de cadeia pesada preferidas compreendem 2 ou mais das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas, conforme descrito acima. Domínios V_H especialmente preferidos compreendem 3 das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima (isto é, uma de cada uma da CDR1, CDR2 e CDR3).
 20 Proteínas de ligação mais preferidas compreendem 3 das CDRs de cadeia leve da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima e 3 das CDRs de cadeia pesada da invenção ou sequências substancialmente homólogas às mesmas conforme descrito acima.
 25

Domínios CDR preferidos e combinações dos mesmos compreendendo os domínios V_H ou V_L são descritos em alguma parte aqui. Contudo, um domínio V_H (ou proteína de ligação) especialmente preferido compreende a CDR3 de GGGVVEF (SEQ ID NO: 5) ou sequências substancialmente homólogas à mesma e um domínio V_L (ou proteína de ligação) especialmente preferido compreende a CDR3 de QQSYSTPRIT (SEQ ID NO: 8) ou sequências substancialmente homólogas à mesma.
 30

Em uma outra modalidade, o domínio V_L (ou proteína de ligação) compreende as regiões CDR de RASQDISSYFA (CDR1) (SEQ ID NO: 6) e/ou AASTLRS (CDR2) (SEQ ID NO: 7) e/ou QQSYSTPRIT (CDR3) (SEQ ID NO: 8) ou sequências substancialmente homólogas às mesmas.

5 Em uma outra modalidade, o domínio V_H (ou proteína de ligação) compreende as regiões CDR de SYAMS (CDR1) (SEQ ID NO: 3) e/ou AISGSGGSTYYADSVKG (CDR2) (SEQ ID NO: 4) e/ou GGGVVEF (CDR3) (SEQ ID NO: 5) ou sequências substancialmente homólogas a qualquer uma das sequências antes mencionadas.

10 Qualquer combinação dos domínios V_L e V_H discutido acima pode estar presente nas proteínas de ligação da invenção.

Modalidades preferidas da invenção proporcionam uma proteína de ligação compreendendo um domínio V_H o qual tem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou sequências substancialmente homólogas à
15 mesma e/ou um domínio V_L o qual tem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 ou sequências substancialmente homólogas à mesma.

Em ainda uma outra modalidade, a presente invenção proporciona uma proteína de ligação compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 (também referida aqui como clone EJ212/007-CI2-5, scFv)
20 ou compreendendo um fragmento da mesma ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

Uma outra modalidade da presente invenção proporciona uma forma de IgG de EJ212/007-CI2-5, a cadeia pesada da qual compreende uma região variável a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ
25 ID NO: 9 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e uma região constante de cadeia pesada e a cadeia leve da qual compreende uma região variável a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e uma região constante de cadeia leve.

30 Uma outra modalidade da presente invenção proporciona uma forma de IgG de EJ212/007-CI2-5, a cadeia pesada da qual compreende uma região variável a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ

ID NO: 9 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e uma região constante a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 12 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e a cadeia leve da qual compreende uma região variável a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma e uma região constante a qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

O termo "proteína de ligação", conforme usado aqui, refere-se à proteínas que se ligam especificamente à outra substância. Em particular, as proteínas de ligação da invenção podem, de preferência, se ligar especificamente à CD166 ou fragmentos de CD166, em particular fragmentos compreendendo ou consistindo nos domínios extracelulares de CD166 ou entidades compreendendo CD166 ou fragmentos de CD166 ou podem inibir ou reduzir significativamente a função de CD166 ou impedir a CD166 de interagir com seus ligantes naturais. Em uma modalidade preferida, as proteínas de ligação são proteínas humanas. Em uma outra modalidade preferida, as proteínas de ligação são anticorpos ou fragmentos de anticorpo ou compreendem anticorpos ou fragmentos de anticorpo. Anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpo humano são especialmente preferidos.

Anticorpos preferidos da invenção compreendem pelo menos uma região variável de cadeia pesada que compreende três CDRs e pelo menos um região variável de cadeia leve que compreende três CDRs. Sequências exemplificativas e preferidas para essas CDRs são descritas aqui. Contudo, embora as proteínas de ligação preferidas da invenção compreendam CDRs da invenção, deve ser notado que as proteínas de ligação da invenção também podem compreender uma ou mais CDRs da invenção em combinação com outras CDRs que não são da invenção, contanto que as propriedades tumor-específicas e, de preferência, as propriedades de ligação à CD166 das proteínas de ligação da invenção conforme esboçado acima ainda estejam presentes.

Contudo, é também bem-documentado na técnica que a presen-

ça de três CDRs do domínio variável de cadeia leve e três CDRs do domínio variável de cadeia pesada de um anticorpo não é necessária para ligação ao antígeno.

Por exemplo, anticorpos de camélídeo (Hamers-Casterman et al., 1993, *Nature*, 363 (6428): 446-448; Arbabi Ghahroudi et al., 1997, *FEBS Lett.*, 414: 521-526) têm um repertório de ligação a antígeno extensivo, mas são desprovidos de cadeias leves. Também, os resultados com anticorpos com um único domínio compreendendo domínios VH apenas (Ward et al., 1989, *Nature*, 341 (6242): 544-546; Davies e Riechmann, 1995, *Biotechnology (NY)*, 13: 475-479) ou domínios VL apenas (van den Beucken et al., 2001, *J. Mol. Biol.*, 310: 591-601) mostram que esses domínios podem se ligar ao antígeno com afinidades aceitavelmente altas. Assim, três CDRs podem se ligar efetivamente ao antígeno.

Também se sabe que uma única CDR ou duas CDRs podem se ligar efetivamente ao antígeno. Como um primeiro exemplo, uma única CDR pode ser inserida em uma proteína heteróloga e conferir capacidade de ligação a antígeno à proteína heteróloga, conforme exemplificado mostrando que uma região CDR3 de VH inserida em uma proteína heteróloga, tal como GFP, confere capacidade de ligação a antígeno à proteína heteróloga (Kiss et al., 2006, *Nucleic Acids Research*, 34(19): e132; Nicaise et al., 2004, *Protein Sci.*, 13: 1882-1891).

Ainda, sabe-se que duas CDRs podem se ligar efetivamente ao antígeno e mesmo conferir propriedades superiores às aquelas possuídas pelo anticorpo precursor. Por exemplo, foi mostrado (Qiu et al., 2007, *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929) que duas CDRs de um anticorpo precursor (uma região CDR1 de VH e uma CDR3 de VL) retêm as propriedades de reconhecimento de antígeno da molécula precursora, mas têm uma capacidade superior de penetrar em tumores. União desses domínios de CDR com uma sequência ligante apropriada (por exemplo, da FR2 de VH) para orientar as CDRs de uma maneira a montar o anticorpo precursor nativo produzido com reconhecimento por antígeno ainda melhor. Portanto, sabe-se na técnica que é possível construir miméticos de anticorpo de ligação a antígeno com-

preendendo dois domínios de CDR (de preferência um de um domínio VH e um de um domínio VL, mais preferivelmente com um dos dois domínios de CDR sendo um domínio CDR3) orientados por meio de uma região de estrutura apropriada para manter a conformação em torno do anticorpo precursor.

5 Assim, embora anticorpos preferidos da invenção possam compreender seis regiões de CDR (três de uma cadeia leve e três de uma cadeia pesada), anticorpos com menos de seis regiões de CDR e tão pouco quanto uma ou duas regiões de CDR são abrangidos pela invenção. Além disso, anticorpos com CDRs apenas da cadeia pesada ou cadeia leve também são considerados.

10 As proteínas de ligação da presente invenção são, de preferência, tumor-específicas pelo fato de que as proteínas de ligação se ligam a um ou mais tipos de célula ou amostra tumoral, mas a ligação a um ou mais tipos de células normais é insignificante ou não impede aplicações diagnósticas ou terapêuticas. Por exemplo, a ligação a um ou mais tipos de célula tumoral pode ser mais forte do que a ligação a um ou mais tipos de células normais. Alternativamente ou além disso, a proteína de ligação pode se ligar ao tecido normal o qual nunca entrará em contato com as proteínas de ligação da invenção, por exemplo, tecido normal no cérebro, proteínas de ligação as quais não atingirão se elas não são administradas ao cérebro porque elas não podem atravessar a barreira sangue/cérebro. De preferência, as proteínas de ligação se ligam a um ou mais tipos de célula ou amostra tumoral, de preferência um ou mais tipos de célula ou amostra de câncer de mama de uma forma ou em um nível que é eficaz para fins diagnósticos ou terapêuticos (por exemplo, mostram ligação significativa e mensurável a um ou mais tipos de células ou amostras tumorais, de preferência células de câncer de mama, mas mostram ligação fraca, de preferência nenhuma ligação significativa a um ou mais tipos de células ou amostras normais). A especificidade por tumores é particularmente desejada quando se quer usar as proteínas de ligação da invenção para terapia ou diagnóstico de tumor.

30 Formas apropriadas de avaliar tal especificidade por tumor são bem-conhecidas e descritas na técnica, por exemplo, através de FACS ou

caracterização de perfil imunohistoquímica na qual, em geral, a ligação de uma proteína de ligação a uma ou várias linhagens ou amostras de células tumorais é comparada com a ligação da proteína a uma ou várias linhagens ou amostras de células normais e a descoberta de uma diferença (ou aumento) significativo na ligação às células tumorais versus normais indica especificidade pelo tumor. Linhagens ou amostras de células normais e tumorais exemplificativas as quais podem ser usadas são bem-conhecidas e descritas na técnica, algumas das quais são descritas nos Exemplos (por exemplo, uma linhagem de célula tumoral apropriada é a linhagem de célula de câncer de mama MDA-MB 231 (ATCC: HTB-26) ou a linhagem de célula de carcinoma de pulmão SW900 (ATCC: HTB-59) e as células normais são células sanguíneas, por exemplo, PBLs ou granulócitos). Por exemplo, as proteínas de ligação preferidas da invenção podem se ligar (por exemplo, mostrar ligação mensurável ou significativa) a uma linhagem de câncer de mama, tal como MDA-MB 231, mas mostram ligação insignificante ou não mensurável a granulócitos ou PBLs (linfócitos de sangue periférico). Colocado de outra forma, tais proteínas de ligação mostram um aumento comparável (e, de preferência, significativo) na ligação a células de câncer de mama, tais como células MDA-MB 231 ou células de câncer de pulmão, tal como células SW900, comparado com células normais, tais como granulócitos ou PBLs.

De preferência, a diferença significativa na ligação é estatisticamente significativa, de preferência com um valor de probabilidade $< 0,1$, de preferência $< 0,05$, mais preferivelmente $< 0,01$. Métodos apropriados de determinação da significância estatística são bem-conhecidos e documentados na técnica e qualquer um desses pode ser usado.

Como um exemplo alternativo para avaliar a especificidade por tumor, caracterização de perfil imunohistoquímica pode ser realizada sobre amostras de tecido normal e tumoral, por exemplo, conforme descrito nos presentes Exemplos. Proteínas de ligação preferidas podem se ligar (por exemplo, mostrar ligação mensurável ou significativa) à amostras de tecido tumoral (por exemplo, amostras de câncer de mama, câncer ovariano, cân-

cer de próstata, câncer de rim ou câncer de cérebro), mas mostram ligação mais fraca, de preferência insignificante ou não mensurável a tecidos normais. Outras proteínas de ligação preferidas podem se ligar a melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ovariano, câncer de pâncreas, câncer de pulmão ou carcinoma de células escamosas esofageais. Em geral, as proteínas de ligação preferidas podem se ligar aos tipos de célula cancerígena os quais expressam o antígeno CD166.

Técnicas imunohistoquímicas podem ser usadas para classificar a ligação das proteínas de ligação às células ou amostras, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 4 e Tabela 3. Proteínas de ligação preferidas mostram escores imunohistoquímicos fracos ou fortes, de preferência fortes.

O termo "humano", conforme usado aqui com relação a moléculas de anticorpo e proteínas de ligação, refere-se à proteínas de ligação tendo regiões variáveis (por exemplo, regiões V_H, V_L, CDR ou FR) e/ou constantes de anticorpo derivadas de ou correspondendo a sequências encontradas em seres humanos, por exemplo, na linhagem germinativa ou células somáticas humanas. As proteínas de ligação "humanas" da invenção ainda incluem resíduos de aminoácido não codificados por sequências humanas, por exemplo, mutações introduzidas através de mutação aleatória ou sítio-dirigida *in vitro* (em particular mutações as quais envolvem substituições conservativas ou mutações em um pequeno número de resíduos da proteína de ligação, por exemplo, em 1, 2, 3, 4 ou 5 dos resíduos da proteína de ligação, de preferência, por exemplo, em 1, 2, 3, 4 ou 5 dos resíduos que compõem uma ou mais das CDRs da proteína de ligação). Assim, os anticorpos "humanos" da invenção incluem sequências derivadas de e relacionadas a sequências encontradas em seres humanos, mas as quais podem não existir naturalmente dentro do repertório da linhagem germinativa de anticorpo humano *in vivo*. Além disso, as proteínas de ligação humanas da presente invenção incluem proteínas compreendendo sequências de consenso humanas identificadas a partir de sequências humanas ou sequências substancialmente homólogas a sequências humanas.

Além disso, as proteínas de ligação humanas da presente invenção não estão limitadas a combinações de regiões V_H , V_L , CDR ou FR as quais são, em si, encontradas em combinação em moléculas de anticorpo humano. Assim, as proteínas de ligação humanas da invenção podem incluir
5 ou corresponder a combinações de tais regiões as quais não existem necessariamente em seres humanos naturalmente.

Em modalidades preferidas, os anticorpos humanos serão anticorpos totalmente humanos. Anticorpos "totalmente humanos", conforme usado aqui, são anticorpos compreendendo domínios de região variável e/ou
10 CDRs "humanas", conforme definido acima, sem sequências de anticorpo não-humano substanciais ou sem quaisquer sequências de anticorpo não-humano. Por exemplo, anticorpos compreendendo domínios de região variável e/ou CDRs humanas "sem sequências de anticorpo não-humano substanciais" são anticorpos, domínios e/ou CDRs nos quais apenas cerca de 5,
15 4, 3, 2 ou 1 aminoácido é um aminoácido que não é codificado por sequências de anticorpo humanas. Assim, anticorpos "totalmente humanos" se distinguem de anticorpos "humanizados", os quais são baseados em domínios de região variável substancialmente não-humanos, por exemplo, domínios de região variável de camundongo, nos quais determinados aminoácidos
20 foram trocados para corresponder melhor aos aminoácidos tipicamente presentes em anticorpos humanos.

Os anticorpos "totalmente humanos" podem ser domínios de região variável e/ou CDRs humanas sem quaisquer outras sequências de anticorpo substanciais, tal como sendo anticorpos com uma única cadeia. Alternativamente, os anticorpos "totalmente humanos" da invenção podem ser
25 domínios de região variável e/ou CDRs humanas integrais com ou operativamente presos a uma ou mais regiões constantes de anticorpo humano. Determinados anticorpos totalmente humanos preferidos são anticorpos de IgG com o complemento total de regiões constantes de IgG.

30 Em outras modalidades, anticorpos "humanos" da invenção serão anticorpos quiméricos com uma parte humana. Anticorpos "quiméricos com uma parte humana", conforme usado aqui, são anticorpos compreen-

dendo domínios de região variável e/ou CDRs "humanas" operativamente presos a ou enxertados sobre uma região constante de uma espécie não-humana, tal como rato ou camundongo. Tais anticorpos quiméricos com uma parte humana podem ser usados, por exemplo, em estudos pré-clínicos, em que a região constante será, de preferência, da mesma espécie de animal usado na testagem pré-clínica. Esses anticorpos quiméricos com uma parte humana também podem ser usados, por exemplo, em diagnóstico *ex vivo*, em que a região constante da espécie não-humana pode proporcionar opções adicionais para detecção de anticorpo.

10 O termo "anticorpo" ou "molécula de anticorpo", conforme usado aqui, refere-se a moléculas de imunoglobulina ou outras moléculas as quais compreendem o domínio de ligação a antígeno.

O termo "anticorpo" ou "molécula de anticorpo", conforme usado aqui, assim, destina-se a incluir anticorpos inteiros (por exemplo, IgG, IgA, IgE, IgM ou IgD, de preferência IgG ou IgM), anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos humanizados e quiméricos. Fragmentos de anticorpo os quais compreendem um domínio de ligação a antígeno também estão incluídos. O termo "fragmento de anticorpo", conforme usado aqui, destina-se a incluir qualquer fragmento de anticorpo apropriado que mostra função de ligação a antígeno (de preferência função de ligação à CD166), por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, dAbs, dímeros TandAbs, minicorpos, diacorpos e multímeros dos mesmos e fragmentos de anticorpo biespecíficos. Anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais. Por exemplo, fragmentos F(ab')₂ podem ser gerados através de tratamento do anticorpo com pepsina. O fragmento F(ab')₂ resultante pode ser tratado para reduzir as ligações em ponte de dissulfeto a fim de produzir fragmentos Fab'. Digestão com papaína pode levar à formação de fragmentos Fab. Fab, Fab' e F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicorpos, diacorpos, fragmentos de anticorpo biespecíficos e outros fragmentos também podem ser sintetizados através de técnicas recombinantes ou podem ser quimicamente sintetizados. Técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo são bem-conhecidas e descritas na

área. Os presentes inventores, *inter alia*, prepararam scFv, Fab e anticorpos de IgG tendo as características de ligação descritas aqui.

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser produzidos naturalmente ou podem ser total ou parcialmente produzidos sinteticamente.

- 5 Assim, o anticorpo pode ser de qualquer fonte apropriada, por exemplo, fontes recombinantes e/ou produzido em animais transgênicos ou plantas transgênicas. Assim, as moléculas de anticorpo podem ser produzidas *in vitro* ou *in vivo*.

- De preferência, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compre-
10 ende uma região variável de cadeia leve de anticorpo (V_L) e uma região variável de cadeia pesada de anticorpo (V_H) as quais, em geral, compreendem o sítio de ligação a antígeno. Em determinadas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende toda ou uma porção de uma região constante de cadeia pesada, tal como uma região constante de IgG1, IgG2,
15 IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM ou IgD. De preferência, a região constante de cadeia pesada é uma região constante de cadeia pesada de IgG1 ou uma porção da mesma. Além disso, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode compreender toda ou uma porção de uma região constante de cadeia leve kappa ou uma região constante de cadeia leve lambda ou uma porção da
20 mesma. De preferência, a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve kappa ou uma porção da mesma. Toda ou parte de tais regiões constantes pode ser produzida naturalmente ou pode ser total ou parcialmente sintética. Sequências apropriadas para tais regiões constantes são bem-conhecidas e documentadas na técnica.

- 25 O termo "fragmento", conforme usado aqui, refere-se a fragmentos de relevância biológica, por exemplo, fragmentos os quais podem contribuir com a ligação ao antígeno, por exemplo, formam parte do sítio de ligação a antígeno ou podem contribuir para a inibição ou redução na função do antígeno ou podem contribuir para a prevenção da interação do antígeno
30 com seus ligantes naturais. Fragmentos preferidos, assim, compreendem uma região variável de cadeia pesada (domínio V_H) e/ou uma região variável de cadeia leve (domínio V_L) dos anticorpos da invenção. Fragmentos prefe-

ridos retêm a capacidade de se ligar a células tumorais e, de preferência, se ligar ao antígeno CD166, conforme descrito em alguma parte aqui (isto é, são fragmentos de ligação a antígeno). Outros fragmentos preferidos compreendem uma ou mais das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada dos anticorpos da invenção (ou dos domínios V_H da invenção) ou uma ou mais das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia leve dos anticorpos da invenção (ou dos domínios V_L da invenção). Fragmentos preferidos têm, assim, pelo menos 5 aminoácidos de comprimento ou compreendem pelo menos uma região CDR, de preferência uma região CDR3, mais preferivelmente uma região CDR3 de cadeia pesada.

Em modalidades onde as proteínas de ligação da invenção compreendem um fragmento de qualquer uma das sequências definidas (por exemplo, compreendem um fragmento de SEQ ID NO: 2), por exemplo, são proteínas de ligação compreendendo domínios V_H e/ou V_L da invenção ou são proteínas de ligação compreendendo uma ou mais CDRs da invenção, então, essas regiões/domínios são geralmente separados dentro da proteína de ligação, de modo que cada região/domínio pode desempenhar sua função biológica e que a contribuição para a ligação ao antígeno seja retida. Assim, os domínios V_H e V_L podem ser separados por sequências de armação/sequências ligantes apropriadas e as CDRs podem ser separadas por regiões de estrutura apropriadas, tal como aquelas encontradas em anticorpos que ocorrem naturalmente. Assim, o V_H , V_L e sequências de CDR individuais da invenção podem ser proporcionados dentro ou incorporados em uma estrutura ou armação apropriada para permitir ligação ao antígeno. Tais sequências ou regiões de estrutura podem corresponder a regiões de estrutura que ocorrem naturalmente, FR1, FR2, FR3 e/ou FR4, conforme apropriado para formar uma armação adequada ou podem corresponder a regiões de estrutura de consenso, por exemplo, identificadas comparando várias regiões de estrutura que ocorrem naturalmente. Alternativamente, armações ou estruturas de não-anticorpo, por exemplo, estruturas de receptor de células T, podem ser usadas.

Sequências apropriadas as quais podem ser usadas para regiões de estrutura são bem-conhecidas e documentadas na técnica e qualquer uma dessas pode ser usada. Sequências preferidas para regiões de estrutura são uma ou mais das regiões de estrutura que compoem os domínios V_H e/ou V_L da invenção, isto é, uma ou mais das regiões de estrutura divulgadas em SEQ ID NO: 2 ou na Tabela 2 ou regiões de estrutura substancialmente homólogas à mesma e, em particular, regiões de estrutura as quais permitem a manutenção de especificidade pelo antígeno, por exemplo, regiões de estrutura as quais resultam na mesma ou substancialmente na mesma estrutura 3D da proteína de ligação. Em modalidades preferidas, todas as quatro regiões FR de SEQ ID NO: 2 (também mostradas na Tabela 2) ou regiões FR substancialmente homólogas às mesmas são encontradas nas proteínas de ligação da invenção.

Além disso, embora as proteínas de ligação preferidas da invenção sejam compostas de V_H , V_L ou CDRs da invenção, deve ser notado que as proteínas de ligação da invenção também abrangem um ou mais V_H , V_L ou CDRs da invenção em combinação com outros V_H , V_L ou CDRs que não são da invenção, contanto que as propriedades tumor-específicas e, de preferência, as propriedades de ligação à CD166, das proteínas de ligação da invenção, conforme esboçado acima, ainda estejam presentes.

O termo "região de determinação de complementaridade de cadeia pesada", conforme usado aqui, refere-se à regiões de hipervariabilidade dentro da região variável de cadeia pesada (domínio V_H) de uma molécula de anticorpo. A região variável de cadeia pesada tem três regiões de determinação de complementaridade denominadas região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1, região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 2 e região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 3 do amino término para o carbóxi término. A região variável de cadeia pesada também tem quatro regiões de estrutura (FR1, FR2, FR3 e FR4 do amino término para o carbóxi término). Essas regiões separam as CDRs.

O termo "região variável de cadeia pesada" (domínio V_H), con-

forme usado aqui, refere-se a região variável de uma cadeia pesada de uma molécula de anticorpo.

O termo "região de determinação de complementaridade de cadeia leve", conforme usado aqui, refere-se à regiões de hipervariabilidade dentro da região variável de cadeia leve (domínio V_L) de uma molécula de anticorpo. Regiões variáveis de cadeia leve têm três regiões de determinação de complementaridade denominadas região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1, região de determinação de complementaridade de cadeia leve 2 e região de determinação de complementaridade de cadeia leve 3 do amino término para o carboxi término. A região variável de cadeia leve também tem quatro regiões de estrutura (FR1, FR2, FR3 e FR4 do amino término para o carboxi término). Essas regiões separam as CDRs.

O termo "região variável de cadeia leve" (domínio V_L), conforme usado aqui, refere-se à região variável de uma cadeia leve de uma molécula de anticorpo.

Deve ser notado que a nomenclatura de Kabat é seguida aqui, onde necessário, de forma a definir o posicionamento das CDRs (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. e Foeller, C. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Moléculas de ácido nucleico compreendendo sequências que codificam as proteínas de ligação da invenção conforme definido acima ou moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas às mesmas formam um outro aspecto da invenção. Moléculas de ácido nucleico preferidas são conforme definido em SEQ ID NO: 1 ou moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas às mesmas. Outras moléculas de ácido nucleico preferidas compreendem sequências as quais codificam a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas às mesmas.

Fragmentos das proteínas de ligação conforme definido acima ou sequências substancialmente homólogas aos mesmos formam um outro

aspecto da invenção.

Consequentemente, a invenção proporciona um polipeptídeo compreendendo ou consistindo em um domínio V_L da invenção conforme definido acima ou uma sequência substancialmente homóloga ao mesmo ou
5 um polipeptídeo compreendendo ou consistindo em um domínio V_H da invenção conforme definido acima ou uma sequência substancialmente homóloga ao mesmo.

Consequentemente, a invenção ainda proporciona um polipeptídeo compreendendo ou consistindo em uma ou mais das regiões CDR da
10 invenção conforme definido acima ou sequências substancialmente homólogas às mesmas.

Quando mais de uma região CDR está presente, combinações preferidas são também conforme descrito acima.

Moléculas de ácido nucleico compreendendo sequências que
15 codificam tais fragmentos das proteínas de ligação da invenção ou moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas às mesmas formam um outro aspecto da invenção. Sequências de ácido nucleico preferidas que codificam tais fragmentos (por exemplo, domínios V_H , domínios V_L e CDRs individuais) podem ser encontradas em SEQ ID NO: 1. assim, uma molécula
20 de ácido nucleico preferida compreende SEQ ID NO: 14 a qual codifica o domínio V_H conforme mostrado na figura 1 ou uma molécula de ácido nucleico substancialmente homóloga ao mesmo e/ou SEQ ID NO: 15 a qual codifica o domínio V_L conforme mostrado na figura 1 ou uma molécula de ácido nucleico substancialmente homóloga ao mesmo.

25 Outras moléculas de ácido nucleico preferidas são aquelas que codificam um domínio V_H ou V_L de uma proteína de ligação da presente invenção, por exemplo, aquelas que codificam SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou sequências substancialmente homólogas às mesmas.

O termo "substancialmente homólogo", conforme usado aqui
30 com relação a uma sequência de aminoácido ou ácido nucleico, inclui sequências tendo pelo menos 50%, de preferência pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente pelo menos

80% e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 80% e mais preferivelmente pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência à sequência de aminoácido ou ácido nucleico divulgada. Sequências substancialmente homólogas da invenção, assim, incluem uma única ou múltiplas alterações de aminoácido ou base (adições, substituições, inserções ou deleções) nas sequências da invenção. A nível de aminoácido, sequências substancialmente homólogas preferidas contêm apenas 1, 2, 3, 4 ou 5, de preferência 1, 2 ou 3, mais preferivelmente 1 ou 2 aminoácidos alterados, em uma ou mais das regiões de estrutura e/ou uma ou mais das CDRs que compõem as sequências da invenção. De preferência, as referidas alterações são substituições conservativas de aminoácido.

As sequências de ácido nucleico substancialmente homólogas também incluem sequências de nucleotídeo que se hibridizam às sequências de ácido nucleico divulgadas (ou suas sequências complementares), por exemplo, se hibridizam às sequências de nucleotídeo que codificam uma ou mais das CDRs de cadeia pesada ou cadeia leve da invenção, as regiões variáveis de cadeias leve ou pesada da invenção ou as proteínas de ligação da invenção (ou se hibridizam a suas sequências complementares) sob condições de hibridização pelo menos moderadamente estridentes.

O termo "substancialmente homóloga" também inclui modificações ou equivalentes químicos das sequências de aminoácido e nucleotídeo da presente invenção que desempenham substancialmente a mesma função que as proteínas ou moléculas de ácido nucleico da invenção substancialmente da mesma forma. Por exemplo, qualquer proteína de ligação substancialmente homóloga (ou o ácido nucleico substancialmente homólogo que codifica a mesma) deverá reter a capacidade de se ligar especificamente a células cancerígenas, de preferência células de câncer de mama. De preferência, qualquer proteína de ligação substancialmente homóloga deverá reter a capacidade de se ligar especificamente ao mesmo antígeno, isto é, o antígeno CD166 e, de preferência, ao mesmo epítipo deste, conforme reconhecido pela proteína de ligação em questão, por exemplo, o mesmo epítipo ou antígeno reconhecido pelos domínios de CDR da invenção ou os do-

minios V_H e V_L da invenção, conforme descrito aqui. A ligação ao mesmo epítopo/antígeno pode ser prontamente testada através de métodos bem-conhecidos e descritos na técnica, por exemplo, usando ensaios de ligação, por exemplo, um ensaio de competição. Assim, aqueles versados na técnica

5 apreciarão que ensaios de ligação podem ser usados para descobrir outros anticorpos e fragmentos de anticorpo com as mesmas especificidades de ligação que os anticorpos e fragmentos de anticorpo da invenção. Conforme exemplificado abaixo, um ensaio de ligação por competição pode ser usado

10 descobrir outros de tais anticorpos. O método descrito abaixo é apenas um exemplo de um ensaio de competição adequado. Aqueles versados na técnica estarão cientes de outros métodos e variações adequados.

Antes que um ensaio de competição seja realizado usando citometria de fluxo, a concentração mínima de anticorpo da injeção (Ab1) que proporciona ligação máxima contra um número fixo de células tumorais, por

15 exemplo, células de câncer de mama, é determinada. Um total de 10^6 células são coletadas de culturas em crescimento exponencial e incubadas com várias concentrações de anticorpo durante 1 hora a 4 °C. As células são lavadas e incubadas com um anticorpo de detecção adequado durante mais uma hora a 4 °C. Após lavagem, as células são analisadas através de cito-

20 metria de fluxo. Para cada anticorpo de teste, uma curva de saturação é gerada a partir dos dados através de plotagem da fluorescência média contra a concentração de anticorpo.

Para o ensaio de competição, células tumorais, por exemplo, células de câncer de mama, são preparadas conforme acima e tratadas em

25 duplicata com uma concentração fixa de anticorpo (Ab1). A concentração fixa é a concentração mínima de anticorpo que gera ligação máxima contra um número fixo de células tumorais, conforme determinado acima. Imediatamente após a adição do Ab1, concentrações variadas do anticorpo inibitório potencial (Ab2) são adicionadas a cada tubo e a mistura incubada duran-

30 te 1 hora a 4 °C. A inibição percentual e alteração com relação à fluorescência média máxima são calculadas subtraindo a fluorescência de base (PBS - FCS a 5%) da leitura de fluorescência média para cada amostra de teste

(Ab1 + Ab2). O resultado é, então, dividido pela fluorescência média de Ab1 apenas (ligação máxima) menos a base (veja abaixo). A inibição percentual resultante é obtida multiplicando-se por 100. A média das réplicas junto com seu respectivo erro padrão é plotada contra a concentração de anticorpo. A fórmula a seguir é usada para calcular a inibição percentual:

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{Bgd})] \times 100$$

onde PI = inibição percentual; $MF_{(Ab1+Ab2)}$ = fluorescência média medida para a mistura de Ab1 + Ab2; e MF_{Bgd} = fluorescência média de base com PBS-FCS a 5%.

Consequentemente, a invenção proporciona uma proteína de ligação capaz de ligação a um antígeno sobre uma célula tumoral, de preferência uma célula de câncer de mama, em que a proteína de ligação pode ser identificada através de um método compreendendo:

(1) incubação de um número fixo de células tumorais com uma concentração mínima de uma proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, de preferência um anticorpo ou fragmento de anticorpo (Ab1) que gera ligação máxima contra o número fixo de células tumorais e medição da fluorescência média do Ab1 (MF_{Ab1});

(2) testagem de duas ou mais concentrações de uma proteína de ligação de teste (Ab2) através da adição de Ab2 ao Ab1 e células tumorais e medição da fluorescência média ($MF_{(Ab1+Ab2)}$);

(3) medição da fluorescência média de base (MF_{Bgd});

(4) cálculo de PI, em que

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{Bgd})] \times 100; \text{ e}$$

(5) comparação da PI com um valor de PI de controle;

em que uma PI que tem uma diferença estatisticamente significativa com relação à PI de controle indica que a proteína de ligação de teste é capaz de ligação ao antígeno sobre a célula tumoral. De preferência, a diferença estatisticamente significativa tem um valor de probabilidade $< 0,05$. Métodos apropriados de determinação da significância estatística são bem-conhecidos e documentados na técnica e qualquer um desses pode ser usado.

Qualquer proteína de ligação substancialmente homóloga deve-

rá, de preferência, reter a especificidade pelo tumor conforme descrito em alguma parte aqui, por exemplo, reter a capacidade de se ligar ao tecido tumoral sem ligação significativa ao tecido normal, mais preferivelmente, deverá reter a capacidade de se ligar especificamente à CD166.

5 Sequências substancialmente homólogas de proteínas da invenção incluem, sem limitação, substituições conservativas de aminoácido ou, por exemplo, alterações as quais não afetam os domínios V_H, V_L ou de CDR das proteínas de ligação, por exemplo, incluem anticorpos scFv onde uma sequência ligante diferente é usada ou proteínas de ligação onde sequên-
10 cias de tag ou outros componentes são adicionados os quais não contribuem para a ligação de antígeno ou alterações para converter um tipo ou formato de molécula ou fragmento de anticorpo a outro tipo ou formato de molécula ou fragmento de anticorpo (por exemplo, conversão de Fab em scFv ou vice-versa) ou a conversão de uma molécula de anticorpo a uma classe ou sub-
15 classe particular de molécula de anticorpo (por exemplo, a conversão de uma molécula de anticorpo em IgG ou uma subclasse da mesma, por exemplo, IgG1 ou IgG3).

 Uma "substituição conservativa de aminoácido", conforme usado aqui, é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo
20 de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não-carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina,
25 serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptano, histidina).

30 A homologia pode ser ensaiada através de qualquer método conveniente. Contudo, para determinação do grau de homologia entre sequências, programas de computador que fazem múltiplos alinhamentos de

sequências são úteis, por exemplo, Clustal W (Thompson, J. D., D.G. Higgins et al. (1994). "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680). Se

5 desejado, o algoritmo Clustal W pode ser usado junto com a matriz de escore BLOSUM 62 (Henikoff S. e Henikoff J.G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915–10919) e uma penalidade por abertura de gap de 10 e uma penalidade por extensão de gap de 0,1, de modo que a combinação de maior

10 grandeza é obtida entre duas sequências, em que pelo menos 50% do comprimento total de uma das sequências estão envolvidos no alinhamento. Outros métodos que podem ser usados para alinhar sequências são o método de alinhamento de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443), conforme revisto por Smith e Waterman (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2: 482), de modo que a combinação de maior grandeza é obtida entre as duas sequên-

15 cias e o número de aminoácidos idênticos é determinado entre as duas sequências. Outros métodos para calcular a identidade percentual entre duas sequências de aminoácido são geralmente reconhecidos na técnica e incluem, por exemplo, aqueles descritos por Carillo e Lipton (*SIAM J. Applied Math.*, 1988, 48: 1073) e aqueles descritos em *Computational Molecular Bio-*

20 *logy*, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*. Geralmente, programas de computador serão empregados para tais cálculos. Programas que comparam e alinham pares de sequências, tais como ALIGN (E. Myers e W. Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS* (1988) 4: 11-17), FASTA (W.R. Pearson e

25 D.J. Lipman (1988), "Improved tools for biological sequence analysis", *PNAS* 85: 2444-2448 e W.R. Pearson (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP e FASTA" *Methods in Enzymology* 183: 63-98) e gapped BLAST (Altschul, S.F., T.L. Madden et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic*

30 *Acids Res.* 25: 3389-3402), BLASTP, BLASTN ou GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12: 387) também são úteis para essa finalidade. Além disso, o servidor Dali no European Bioinformatics Institute oferece ali-

nhamentos baseados em estrutura de sequências de proteína (Holm, J. of Mol. Biology, 1993, Vol. 233: 123-38; Holm, Trends in Biochemical Sciences, 1995, Vol 20: 478-480; Holm, Nucleic Acid Research, 1998, Vol. 26: 316-9).

5 Como forma de proporcionar um ponto de referência, sequências de acordo com a presente invenção tendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% de homologia, etc. podem ser determinadas usando o programa ALIGN com parâmetros de default (por exemplo, disponível na Internet no servidor de rede GENESTREAM, IGH, Montpellier, França).

10 Por "condições de hibridização pelo menos moderadamente estridentes" entenda-se que são selecionadas condições as quais promovem hibridização seletiva entre duas moléculas de ácido nucleico complementares em solução. Hibridização pode ocorrer a toda ou uma porção de uma molécula de ácido nucleico. A porção de hibridização tem, tipicamente, pelo menos 15 (por exemplo, 20, 25, 30, 40 ou 50) nucleotídeos de comprimento.

15 Aqueles versados na técnica reconhecerão que a estabilidade de uma dupla ou híbridos de ácido nucleico é determinada pela T_m a qual, em tampões contendo sódio, é uma função da concentração de íons de sódio e temperatura ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/\text{l})$ ou equação similar). Consequentemente, os parâmetros nas condições de lavagem que

20 determinam a estabilidade do híbrido são a concentração de íons de sódio e temperatura. De forma a identificar moléculas que são similares, mas não idênticas, a uma molécula de ácido nucleico conhecida, uma combinação errônea de 1% pode ser admitida como resultando em uma diminuição de cerca de 1°C na T_m . Por exemplo, se são consideradas moléculas de ácido

25 nucleico que têm >95% de identidade, a temperatura de lavagem final será reduzida em cerca de 5°C . Baseado nessas considerações, aqueles versados na técnica serão capazes de selecionar prontamente condições de hibridização apropriadas. Em modalidades preferidas, condições de hibridização estridentes são selecionadas. À guisa de exemplo, as seguintes condições

30 podem ser empregadas para obter hibridização estrigente: hibridização em 5x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC)/5x solução de Denhardt/SDS a 1,0% em uma $T_m - 5^\circ\text{C}$ baseado na equação acima, seguido por uma lava-

gem com 0,2x SSC/SDS a 0,1% a 60 °C. Condições de hibridização moderadamente estridentes incluem uma etapa de lavagem em 3x SSC a 42 °C.

5 À guisa de outro exemplo, sequências as quais "hibridizam" são aquelas sequências que se ligam (hibridizam) sob condições não estridentes (por exemplo, 6 x SSC, formamida a 50% em temperatura ambiente) e lavadas sob condições de baixa estridência (por exemplo, 2 x SSC, temperatura ambiente, mais preferivelmente 2 x SSC, 42 °C) ou condições de maior estridência (por exemplo, 2 x SSC, 65 °C) (onde SSC = NaCl a 0,15M, citrato de sódio a 0,015 M, pH de 7,2).

10 Deve ser entendido, contudo, que estridências equivalentes podem ser obtidas usando tampões, sais e temperaturas alternativas. Orientação adicional com relação às condições de hibridização pode ser encontrada em: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1–6.3.6 e em: Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory
15 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol.3.

De modo geral, sequências as quais hibridizam sob condições de alta estridência são preferidas, assim como sequências as quais, em virtude da degenerância do código genético, se hibridizariam sob condições de alta estridência.

20 O polipeptídeo, proteína de ligação e moléculas de ácido nucleico da invenção são, em geral, moléculas isoladas ou purificadas na medida em que eles não estão presentes *in situ* dentro do corpo de um ser humano ou animal ou uma amostra tecidual derivada do corpo de um ser humano ou animal. As sequências podem, contudo, corresponder a ou ser substancial-
25 mente homólogas às sequências conforme encontrado no corpo de um ser humano ou animal. Assim, o termo "isolada" ou "purificada", conforme usado aqui em referência a moléculas ou sequências de ácido nucleico e proteínas ou polipeptídeos, refere-se a tais moléculas quando isoladas de ou purificadas de ou substancialmente isentas de seu ambiente natural, por exemplo,
30 isoladas do corpo de um ser humano ou animal (se necessário elas ocorrem naturalmente) ou refere-se a tais moléculas quando produzidas através de um processo técnico, isto é, inclui moléculas recombinantes e sinteticamente

produzidas.

Assim, quando usado com relação a uma molécula de ácido nucleico, tal termo pode referir-se a um ácido nucleico substancialmente isento de material com o qual ela está naturalmente associada, tais como outros ácidos nucleicos/genes ou polipeptídeos. Esse termo também pode referir-se a um ácido nucleico substancialmente isento de material celular ou meio de cultura quando produzido através de técnicas de DNA recombinante ou substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizado. Um ácido nucleico isolado ou purificado pode também ser substancialmente isento de sequências as quais flanqueiam naturalmente o ácido nucleico (isto é, sequências localizadas nas extremidades 5' e 3' do ácido nucleico) das quais o ácido nucleico é derivado ou sequências as quais foram feitas para flanquear o ácido nucleico (por exemplo, sequências de tag ou outras sequências as quais não têm valor terapêutico), por exemplo, através de engenharia genética.

Assim, quando usado com relação a uma proteína ou molécula de polipeptídeo, tais como regiões de complementaridade 1, 2 e 3 de cadeia leve, regiões de complementaridade 1, 2 e 3 de cadeia pesada, regiões variáveis de cadeia leve, regiões variáveis de cadeia pesada e proteínas de ligação da invenção, o termo "isolado" ou "purificado" pode referir-se a uma proteína substancialmente isenta de material celular ou outras proteínas da fonte da qual ela é derivada. Em algumas modalidades, particularmente onde a proteína tem de ser administrada a seres humanos ou animais, tais proteínas isoladas ou purificadas são substancialmente isentas de meio de cultura quando produzidas através de técnicas recombinantes ou precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizadas quimicamente. Tais proteínas isoladas ou purificadas também podem ser isentas de sequências de flanqueamento, tais como aquelas descritas acima para as moléculas de ácido nucleico isoladas.

O termo "sequência de ácido nucleico" ou "molécula de ácido nucleico", conforme usado aqui, refere-se a uma sequência de monômeros de nucleosídeo ou nucleotídeo consistindo em bases que ocorrem natural-

mente, açúcares e ligações interaçúcar (parte principal). O termo também inclui sequências modificadas ou substituídas compreendendo monômeros que não ocorrem naturalmente ou porções dos mesmos. As sequências de ácido nucleico da presente invenção podem ser sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou sequências de ácido ribonucleico (RNA) e podem 5 incluir bases que ocorrem naturalmente, incluindo adenina, guanina, citosina, timidina e uracila. As sequências também podem conter bases modificadas. Exemplos de tais bases modificadas incluem aza e deaza adenina, guanina, citosina, timidina e uracila; e xantina e hipoxantina. As moléculas de ácido 10 nucleico podem ser fita dupla ou fita simples. As moléculas de ácido nucleico podem ser total ou parcialmente sintéticas ou recombinantes.

Aqueles versados na técnica apreciarão que as proteínas e polipeptídeos da invenção, tais como as regiões de determinação de complementaridade de cadeias leve e pesada, as regiões variáveis de cadeias 15 leve e pesada, proteínas de ligação, anticorpos e fragmentos de anticorpo e imunoconjugados, podem ser preparados através de qualquer uma de várias maneiras bem-conhecidas e descritas na técnica, mas são, mais preferivelmente, preparados usando métodos recombinantes.

Consequentemente, as moléculas de ácido nucleico da presente 20 invenção podem ser clonadas ou sintetizadas através de qualquer método apropriado e podem ser incorporadas de uma maneira conhecida em um vetor de expressão apropriado o qual assegura boa expressão das proteínas da invenção. Possíveis vetores de expressão incluem, mas não estão limitados a, cosmídeos, plasmídeos ou vírus modificados (por exemplo, retrovírus, 25 adenovírus e vírus adeno-associados replicação-defectivos), na medida em que o vetor seja compatível com a célula hospedeira usada. Os vetores de expressão são "adequados para transformação de uma célula hospedeira", o que significa que os vetores de expressão contêm uma molécula de ácido nucleico da invenção e sequências regulatórias selecionadas com base nas 30 células hospedeiras usadas para expressão, as quais são operativamente ligadas à molécula de ácido nucleico. Operativamente ligada destina-se a significar que o ácido nucleico é ligado a sequências regulatórias de uma

maneira a qual permite a expressão do ácido nucleico.

A invenção, portanto, considera um vetor de expressão recombinante contendo uma molécula de ácido nucleico da invenção ou um fragmento da mesma e as sequências regulatórias necessárias para a transcrição e tradução da sequência de proteína codificada pela molécula de ácido nucleico da invenção.

Sequências regulatórias adequadas podem ser derivadas de uma variedade de fontes, incluindo genes bacterianos, fúngicos, virais, de mamífero ou insetos (por exemplo, veja as sequências regulatórias descritas em Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Seleção de sequências regulatórias apropriadas é dependente da célula hospedeira escolhida conforme discutido abaixo e pode ser prontamente realizada por aqueles versados na técnica. Exemplos de tais sequências regulatórias incluem: um promotor e intensificador transcricional ou sequência de ligação de RNA polimerase, uma sequência de ligação ribossômica, incluindo um sinal de início de tradução. Adicionalmente, dependendo da célula hospedeira escolhida e do vetor empregado, outras sequências, tais como uma origem de replicação, sítios de restrição de DNA adicionais, intensificadores e sequências que conferem capacidade de indução de transcrição podem ser incorporadas no vetor de expressão.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção também podem conter um gene marcador selecionável o qual facilita a seleção de células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma molécula recombinante da invenção. Exemplos de genes marcadores selecionáveis são genes que codificam uma proteína, tal como neomicina e higromicina, os quais conferem resistência a determinados fármacos, β -galactosidase, acetiltransferase de cloranfenicol, luciferase de vaga-lume ou uma imunoglobulina ou porção da mesma, tal como a porção Fc de uma imunoglobulina, de preferência IgG. Transcrição do gene marcador selecionável é monitorada por alterações na concentração da proteína marcadora selecionável, tal como β -galactosidase, acetiltransferase de cloranfenicol ou luciferase de vaga-

lume. Se o gene marcador selecionável codifica uma proteína que confere resistência a antibiótico, tal como resistência à neomicina, células transformantes podem ser selecionadas com G418. Células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão, enquanto que as outras células morrerão. Isso torna possível visualizar e ensaiar a expressão de vetores de expressão recombinantes da invenção e, em particular, determinar o efeito de uma mutação sobre a expressão e fenótipo. Será apreciado que marcadores selecionáveis podem ser introduzidos em um vetor distinto do ácido nucleico de interesse.

Os vetores de expressão recombinantes também podem conter genes os quais codificam uma porção de fusão a qual proporciona expressão aumentada da proteína recombinante; solubilidade aumentada da proteína recombinante; e auxiliam na purificação da proteína recombinante-alvo atuando como um ligante em purificação por afinidade (por exemplo, "tags" apropriadas para permitir a purificação e/ou identificação podem estar presentes, por exemplo, tags His ou tags myc). Por exemplo, um sítio de clivagem proteolítica pode ser adicionado à proteína recombinante-alvo para permitir a separação da proteína recombinante da porção de fusão subsequentemente à purificação da proteína de fusão. Vetores de expressão típicos incluem pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Austrália), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), os quais fundem S-transferase de glutathione (GST), proteína de ligação maltose E ou proteína A, respectivamente, à proteína recombinante.

Vetores de expressão recombinantes podem ser introduzidos em células hospedeiras para produzir uma célula hospedeira transformada. Os termos "transformada com", "transfectada com", "transformação" e "transfecção" destinam-se a abranger a introdução de ácido nucleico (por exemplo, em um vetor) em uma célula através de muitos possíveis métodos conhecidos na técnica. O termo "célula hospedeira transformada", conforme usado aqui, destina-se também a incluir células capazes de glicosilação que tenham sido transformadas com um vetor de expressão recombinante da invenção. Células procariotas podem ser transformadas com um ácido nucleico

co, por exemplo, transformação mediada por cloreto de cálcio ou eletroporação. Por exemplo, ácido nucleico pode ser introduzido em células de mamífero via técnicas convencionais, tais como coprecipitação com cloreto de cálcio ou fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, lipofec-
 5 tina, eletroporação ou microinjeção. Métodos adequados para transformação e transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) e outros livros-texto de laboratório.

Células hospedeiras adequadas incluem uma ampla variedade
 10 de células hospedeiras eucariotas e células procariotas. Por exemplo, as proteínas da invenção podem ser expressas em células de levedo ou células de mamífero. Outras células hospedeiras adequadas podem ser encontradas em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991). Além disso, as proteínas da
 15 invenção podem ser expressas em células procariotas, tal como *Escherichia coli* (Zhang et al., Science 303(5656): 371-3 (2004)).

Células hospedeiras de levedo e fungo adequadas para realização da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, *Saccharomyces cerevisiae*, os gêneros *Pichia* ou *Kluyveromyces* e várias espécies do
 20 gênero *Aspergillus*. Exemplos de vetores para expressão em levedo *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari et al., Embo J. 6: 229-234 (1987)), pMFA (Kurjan e Herskowitz, Cell 30: 933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz et al., Gene 54: 113-123 (1987)) e pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Protocolos para a transformação de levedos e fungos são bem-conhecidos por
 25 aqueles versados na técnica (veja Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929 (1978); Itoh et al., J. Bacteriology 153: 163 (1983) e Cullen et al. (BiolTechnology 5: 369 (1987)).

Células de mamífero adequadas para realização da presente invenção incluem, dentre outras: células COS (por exemplo, ATCC No. CRL
 30 1650 ou 1651), BHK (por exemplo, ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (por exemplo, ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573) e NS-1. Vetores de expressão adequados para dirigir a expressão em células

de mamífero geralmente incluem um promotor (por exemplo, derivado de um material viral, tal como polioma, adenovírus 2, citomegalovírus e Vírus Simian 40), bem como outras sequências de controle transcricional e traducional. Exemplos de vetores de expressão de mamífero incluem pCDM8 (Seed, B.,
 5 Nature 329: 840 (1987)) e pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J. 6: 187-195 (1987)).

Dados os ensinamentos fornecidos aqui, promotores, terminadores e métodos para introdução de vetores de expressão de um tipo apropriado em células de planta, ave e inseto também podem ser prontamente obti-
 10 dos. Por exemplo, dentro de uma modalidade, as proteínas da invenção podem ser expressas a partir de células de planta (veja Sinkar et al., J. Biosci (Bangalore) 11: 47-58 (1987), o qual revisa o uso de vetores de *Agrobacterium rhizogenes*; veja também Zambryski et al., Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender e Setlow (eds.), Vol. VI, páginas 253-278,
 15 Plenum Press, New York (1984), o qual descreve o uso de vetores de expressão para células de planta incluindo, dentre outros, PAPS2022, PAPS2023 e PAPS2034).

Células de inseto adequadas para realização da presente invenção incluem células e linhagens de célula de espécies *Bombyx*, *Trichoplusia*
 20 ou *Spodoptera*. Vetores de baculovírus adequados para expressão de proteínas em células de inseto cultivadas (células SF9) incluem a série pAc (Smith et al., Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165 (1983)) e a série pVL (Lucklow, V.A. e Summers, M.D., Virology 170: 31-39 (1989)). Alguns sistemas de expressão de células de inseto-baculovírus adequados para expressão das proteínas
 25 recombinantes da invenção são descritos no PCT/US/02442.

Alternativamente, as proteínas da invenção também podem ser expressas em animais transgênicos não-humanos, tais como ratos, coelhos, ovelha e porcos (Hammer et al., Nature 315: 680-683 (1985); Palmiter et al., Science 222: 809-814 (1983); Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:
 30 4438-4442 (1985); Palmiter e Brinster, Cell 41: 343-345 (1985) e Patente U.S. No. 4.736.866).

As proteínas da invenção também podem ser preparadas atra-

vés de síntese química usando técnicas bem-conhecidas na química de proteínas, tais como síntese em fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149-2154 (1964); Frische et al., J. Pept. Sci. 2(4): 212-22 (1996)) ou síntese em solução homogênea (Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I e II, Thieme, Stuttgart (1987)).

Proteínas de fusão N-terminal ou C-terminal compreendendo as proteínas da invenção conjugadas a outras moléculas, tais como proteínas, podem ser preparadas através de fusão, por meio de técnicas recombinantes. As proteínas de fusão resultantes contêm uma proteína da invenção fundida à proteína ou proteína marcadora ou proteína de tag selecionada, conforme descrito aqui. As proteínas da invenção também podem ser conjugadas a outras proteínas através de técnicas conhecidas. Por exemplo, as proteínas podem ser acopladas usando ligantes contendo tiol heterobifuncionais, conforme descrito no WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditiopropionato) ou N-succinimidil-5 tioacetato. Exemplos de proteínas as quais podem ser usadas para preparar proteínas de fusão ou conjugados incluem proteínas de ligação celular, tais como imunoglobulinas, hormônios, fatores de crescimento, lectinas, insulina, lipoproteína de baixa densidade, glucagon, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína, glutathione-S-transferase (GST), hemaglutinina (HA) e myc truncada.

Consequentemente, a invenção proporciona um vetor de expressão recombinante compreendendo uma ou mais das sequências de ácido nucleico da invenção ou uma ou mais das sequências de ácido nucleico que codificam as proteínas da invenção (tais como as regiões de determinação de complementaridade de cadeias pesada e leve, as regiões variáveis de cadeias pesada e leve ou as proteínas de ligação, tais como anticorpos e fragmentos de anticorpo).

Ainda, a invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo um ou mais dos vetores recombinantes ou uma ou mais das sequências de ácido nucleico da invenção ou uma célula hospedeira expressando uma ou mais das proteínas da invenção (tais como as regiões de determinação de complementaridade de cadeias pesada e leve, as regiões va-

riáveis de cadeias pesada e leve ou as proteínas de ligação, tais como anticorpos e fragmentos de anticorpo).

Um outro aspecto da invenção proporciona um método de produção de uma proteína da presente invenção compreendendo uma etapa de cultura das células hospedeiras da invenção. Métodos preferidos compreendem as etapas de (i) cultura de uma célula hospedeira compreendendo um ou mais dos vetores de expressão recombinantes ou uma ou mais das sequências de ácido nucleico da invenção sob condições adequadas para a expressão da proteína; e opcionalmente (ii) isolamento da proteína da célula hospedeira ou do meio de crescimento/sobrenadante. Tais métodos de produção podem também compreender uma etapa de purificação do produto de proteína e/ou formulação do produto em uma composição incluindo pelo menos um componente adicional, tal como um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável.

Em modalidades quando a proteína da invenção é composta de mais de uma cadeia polipeptídica (por exemplo, determinados fragmentos, tais como fragmentos Fab), então, todos os polipeptídeos são, de preferência, expressos na célula hospedeira, seja a partir do mesmo ou de um vetor de expressão diferente, de modo que proteínas completas, por exemplo, proteínas de ligação da invenção, possam ser montadas na célula hospedeira e isoladas da mesma.

As proteínas de ligação da invenção têm especificidade por células tumorais, em particular células de carcinoma de mama. Assim, as proteínas de ligação da invenção podem ser usadas para detectar ou diagnosticar células tumorais, de preferência células de carcinoma de mama *in vivo* ou *in vitro*. Assim, as proteínas de ligação da invenção podem objetivar locais no corpo nos quais células tumorais, de preferência células de carcinoma de mama, estão presentes, quando do que a proteína de ligação pode atuar no local-alvo (por exemplo, tecido, órgão ou células-alvo).

As proteínas de ligação da invenção têm, de preferência, especificidade pelo antígeno CD166. Assim, as proteínas de ligação da invenção podem ser usadas para detectar CD166 *in vivo* ou *in vitro*. Assim,

as proteínas de ligação da invenção podem objetivar os locais no corpo os quais expressam o antígeno CD166, quando do que a proteína de ligação pode atuar no local-alvo (por exemplo, tecido, órgão ou células-alvo).

5 As proteínas de ligação da invenção têm, de preferência, a capacidade de induzir à citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) de células tumorais, de preferência células de câncer de mama, câncer de pulmão e/ou câncer de próstata. Um teste *in vitro* adequado para ADCC é descrito no Exemplo 5. Assim, as proteínas de ligação da invenção podem, por exemplo, causar morte de pelo menos 1%, 3% ou 5% de células
10 tumorais *in vitro*, de preferência células de câncer de mama, câncer de pulmão e/ou câncer de próstata, de preferência pela morte de pelo menos cerca de 10%, 15% ou 20% de células tumorais *in vitro*, de preferência células de câncer de mama, câncer de pulmão e/ou câncer de próstata. Tal efeito demonstra que as proteínas de ligação podem ser usadas para
15 recrutar o sistema imune do paciente para combater células tumorais (isto é, podem ser potencialmente úteis terapeuticamente sem a necessidade de um agente ativo adicional). Isso é claramente uma propriedade vantajosa.

As proteínas de ligação da invenção têm, de preferência, a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais, de preferência
20 células de câncer de mama. A referida inibição poderia ser demonstrada *in vitro* ou *in vivo*. Um teste *in vitro* adequado para inibição de crescimento é descrito no Exemplo 6, o qual envolve a medição da fluorescência de células rotuladas com uma quantidade fixa de um corante. Divisão celular causa uma redução na fluorescência à medida que o corante é dividido entre
25 células filha e, se divisão celular é inibida, há menos redução de fluorescência. A fluorescência de diferentes população de teste pode, assim, ser comparada para avaliar o efeito inibitório de crescimento de proteínas de ligação candidatas.

De preferência, as proteínas de ligação inibem o crescimento
30 celular em pelo menos 5% ou 10%, mais preferivelmente pelo menos 15, 20 ou 25%, quando testadas durante um período de 7 dias *in vitro*.

Um teste *in vivo* adequado para inibição de crescimento é

descrito no Exemplo 9.

As proteínas de ligação da invenção têm, de preferência, a capacidade de induzir à apoptose de células tumorais, de preferência células de câncer de mama, opcionalmente em combinação com um agente pró-apoptótico adicional.

De preferência, as capacidades descritas acima são observadas em um nível mensurável ou significativo e, mais preferivelmente, um nível estatisticamente significativo, quando comparado com condições de controle apropriado. Níveis de significância apropriados são discutidos em alguma parte aqui.

Além disso, as proteínas de ligação da invenção podem ser conjugadas a outras entidades e usadas para objetivar essas outras entidades a locais do corpo nos quais células tumorais, de preferência células de carcinoma de mama e/ou células as quais expressam CD166, estão presentes. (Onde a proteína de ligação é uma molécula de anticorpo, então, tais conjugados também são referidos como imunoconjugados). Essas outras entidades poderiam ser rótulos ou outras porções detectáveis, caso no qual essas moléculas de conjugado seriam úteis para diagnóstico ou formação de imagem *in vitro* ou *in vivo* de locais do corpo, em particular locais do corpo afetados com câncer. Rótulos e porções detectáveis adequados são discutidos em alguma parte aqui. Alternativamente, as proteínas de ligação da invenção poderiam ser conjugadas a moléculas biologicamente ativas ou agentes medicamente relevantes, tais como toxinas, enzimas, fármacos, pré-fármacos, pró-fármacos ou outros compostos de pequena molécula ou moléculas de ácido nucleico (por exemplo, moléculas antissenso), caso no qual essas moléculas de conjugado seriam úteis para terapia objetivada, por exemplo, através de objetivação do fármaco, toxina ou enzima, etc. às células ou locais do corpo nos quais células de carcinoma estão presentes. Tais moléculas biologicamente ativas ou agentes medicamente relevantes podem estar em uma forma ativa ou em uma forma a qual tem de ser ativada, por exemplo, no corpo. Em particular, tais moléculas poderiam ser usadas para objetivação de células cancerí-

genas, por exemplo, células de câncer de mama.

Conjugados de proteína de ligação são, assim, proteínas de ligação preferidas da invenção. Proteínas de ligação preferidas a serem usadas nos conjugados são anticorpos de comprimento total (inteiros),

5 F(ab')₂, Fab ou scFv.

Métodos para conjugação dessas outras entidades às proteínas de ligação da invenção são bem-conhecidos e descritos na técnica e um método apropriado pode ser prontamente selecionado, dependendo da natureza da proteína de ligação e da outra entidade a ser conjugada. Assim, as
10 outras entidades podem ser conjugadas às proteínas de ligação da invenção diretamente ou via um intermediário, por exemplo, um ligante apropriado. A conjugação poderia, por exemplo, ser covalente ou não-covalente (por exemplo, as outras entidades podem ser conjugadas a uma proteína de ligação via a formação de um complexo com a proteína de ligação ou, mais
15 convenientemente, com uma entidade de ligação intermediária, tal como um grupo químico ou uma tag peptídica). Tal ligação como um complexo é, por exemplo, apropriada para muitos radioisótopos.

Em tais modalidades, as proteínas de ligação (por exemplo, o anticorpo ou fragmento de anticorpo), junto com a entidade conjugada, poderiam ser incluídas ou incorporadas em uma membrana artificial formando,
20 por exemplo, uma partícula artificial, tal como uma micela, lipossoma ou nanopartícula. Essas partículas seriam orientadas a um local-alvo no corpo em virtude da proteína de ligação e poderiam, então, se fundir com as células no local-alvo (ou ser internalizadas - veja abaixo), desse modo, liberando a entidade conjugada, por exemplo, as moléculas biologicamente ativas ou agentes medicamente relevantes, de dentro da partícula artificial na célula-alvo,
25 por exemplo, uma célula tumoral. Novamente, métodos de incorporação de moléculas em tais membranas artificiais são bem-conhecidos e descritos na técnica.

30 Algumas proteínas de ligação (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de anticorpo) são capazes de ser internalizadas nas células com as quais elas se tornam ligadas. Assim, em uma modalidade da presente in-

venção, as proteínas de ligação da invenção são capazes de ser internalizadas. Essa propriedade é particularmente vantajosa para uso em conjugados, por exemplo, conjugados conforme discutido acima, em modalidades onde a molécula biologicamente ativa ou agente medicamente relevante seria internalizado com as moléculas de anticorpo. Em geral, a internalização de uma proteína de ligação é dependente do antígeno e da taxa com a qual o referido antígeno é reciclado entre a membrana celular e o citosol. Assim, fornecimento de uma proteína de ligação interage com seu antígeno (CD166) com uma afinidade suficiente, de modo que a proteína de ligação não se dissocia do antígeno (CD166) antes que o antígeno seja internalizado, então, a proteína de ligação também será internalizada. Isso é claramente vantajoso para determinadas modalidades enquanto que, em outras modalidades, proteínas de ligação que mostram apenas baixas taxas de internalização são vantajosas.

A taxa de internalização pode, assim, variar entre diferentes proteínas de ligação da invenção e, para algumas proteínas de ligação, pode corresponder essencialmente à taxa básica na qual anticorpos que se ligam a moléculas na superfície celular são, tipicamente, renovados por suas células-alvo (por exemplo, cerca de 10% da proteína de ligação são internalizados dentro de 2 horas) mas, para outras proteínas de ligação, a taxa de internalização pode ser maior, por exemplo, pelo menos 10, 20 ou 30% de internalização dentro de 30 minutos. Aqueles versados na técnica estarão cientes de formas para ensaiar a internalização, por exemplo, usando rotulação por fluorescência com diferencial de temperatura quando de citometria de fluxo ou microscopia confocal. Um exemplo de um ensaio adequado é descrito no Exemplo 7, no qual um anticorpo secundário rotulado com um corante sensível ao pH (CypHer5E), o qual é minimamente fluorescente em um pH básico (conforme encontrado fora das células) e maximamente fluorescente em um pH ácido (conforme encontrado dentro das células) é usado.

Assim, pode ser observado que um outro aspecto da invenção proporciona proteínas de ligação (por exemplo, conjugados de proteínas de

ligação) ou outras proteínas da invenção, conforme definido aqui, para uso em terapia, diagnóstico ou formação de imagem.

Além disso, a invenção proporciona composições compreendendo as proteínas de ligação da invenção, tais como anticorpos e fragmentos de anticorpo, com um ou mais excipientes, veículos, diluentes, tampões ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis.

Tais composições podem ser usadas em quaisquer aspectos da invenção descritos aqui onde uma proteína de ligação é usada, por exemplo, podem ser usadas em qualquer um dos métodos, usos ou kits, conforme descrito aqui.

Um outro aspecto da invenção proporciona o uso das proteínas de ligação (por exemplo, conjugados de proteína de ligação) ou outras proteínas da invenção conforme definido aqui na farmacologicamente aceitável de uma composição ou medicamento para uso em terapia, formação de imagem ou diagnóstico.

Métodos de tratamento de um indivíduo compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de uma proteína de ligação (por exemplo, conjugado de proteína de ligação) ou outra proteína da invenção conforme definido aqui a um indivíduo ou a uma amostra (por exemplo, uma amostra de sangue) removida de um indivíduo e a qual é subsequentemente retornada ao indivíduo proporcionam ainda outros aspectos da invenção.

Os métodos *in vivo*, conforme descritos aqui, são geralmente realizados em um mamífero. Qualquer mamífero pode ser tratado, por exemplo, seres humanos e qualquer animal e criação, doméstico ou de laboratório. Exemplos específicos incluem camundongos, ratos, porcos, gatos, cães, ovelha, coelhos, vacas e macacos. De preferência, contudo, o mamífero é um ser humano.

Os termos "terapia" ou "tratamento", conforme usado aqui, incluem terapia profilática, a qual pode resultar na prevenção da doença. Os termos "terapia" e "tratamento" incluem combate ou cura da doença, mas também incluem o controle, redução ou alívio da doença ou um ou mais dos sintomas associados à mesma. Os anticorpos da invenção também podem ser

usados em aplicações prognósticas, por exemplo, para doenças nas quais os níveis de CD166 estão alterados. Assim, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para prognóstico de câncer. Por exemplo, é reportado que CD166 encontra-se livre na corrente sanguínea em cânceres mais agressivos. Assim, detecção de níveis elevados de CD166 no sangue usando os anticorpos da presente invenção pode ser útil para prognóstico de cânceres agressivos, por exemplo, metastáticos.

Uma "quantidade eficaz", conforme usado aqui, pode se referir a uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilaticamente eficaz, dependendo da natureza do tratamento. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser considerada como sendo uma quantidade necessária (em dosagens e regimes de administração apropriados) para obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade profilaticamente eficaz pode ser considerada como sendo uma quantidade necessária (em dosagens e regimes de administração apropriados) para obter o resultado profilático desejado. Conforme indicado abaixo, as quantidades são prováveis de variar dependendo do peso, idade e sexo do paciente, a gravidade da doença e a capacidade da proteína de ligação de estimular uma resposta desejada no indivíduo.

As composições da presente invenção podem ser formuladas de acordo com qualquer um dos métodos convencionais conhecidos na técnica e amplamente descritos na literatura. Assim, o ingrediente ativo (isto é, a proteína de ligação) pode ser incorporada, opcionalmente junto com outras substâncias ativas (exemplos das quais são descritos abaixo), com um ou mais veículos, diluentes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis convencionais, etc., apropriados para o uso particular para uma composição, a fim de produzir preparados convencionais os quais são adequados ou podem ser tornados adequados para administração. Elas podem ser formuladas como líquidos, como semissólidos ou como sólidos, por exemplo, soluções líquidas, dispersões, suspensões, comprimidos, pílulas, pós, saches, pequenas cápsulas, elixires, emulsões, xaropes, pomadas, lipossomas, supositórios e similares. A forma preferida depende do modo pretendido de

administração e aplicação terapêutica. De preferência, a composição compreendendo a proteína de ligação da invenção é preparada em uma forma de uma solução injetável ou passível de infusão.

O modo preferido de administração é parenteral, por exemplo, intraperitoneal, intravenoso, subcutâneo, intramuscular, intracavidade ou transdérmico, embora qualquer outro modo apropriado possa ser usado, por exemplo, administração oral. Injeção ou infusão intravenosa é especialmente preferida. Qualquer local de administração apropriado pode ser usado. Por exemplo, elas podem ser administradas local e diretamente ao local onde ação é requerida ou podem ser presas ou de outro modo associadas, por exemplo, conjugadas, com entidades as quais facilitam a objetivação a um local apropriado no corpo.

Qualquer veículo, excipiente, diluente, tampão ou estabilizante fisiologicamente compatível pode ser usado nas composições da invenção. Exemplos de veículos, excipientes, diluentes, tampões e estabilizantes adequados incluem um ou mais de água, solução salina, solução salina tampoadas com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, bem como combinações dos mesmos. Em alguns casos, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poli álcoois (por exemplo, manitol, sorbitol) ou cloreto de sódio podem ser incluídos. As composições podem, adicionalmente, incluir agentes de lubrificação, agentes de umedecimento, agentes de emulsificação, agentes de suspensão, agentes conservantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes e similares. As composições da invenção podem ser formuladas de modo a proporcionar liberação rápida, sustentada ou retardada do ingrediente ativo após administração ao indivíduo empregando procedimentos bem-conhecidos na técnica. Conforme descrito acima, de preferência, a composição está em uma forma adequada para injeção e veículos adequados podem estar presentes em qualquer concentração apropriada, mas concentrações exemplificativas são de 1% a 20% e, de preferência, de 5% a 10%.

Composições terapêuticas devem, tipicamente, ser estéreis e estáveis sob condições de fabricação e armazenamento. Formas apropriadas de obtenção de tal esterilidade e estabilidade são bem-conhecidas e

descritas na técnica.

Além de uma proteína de ligação da invenção, a composição pode ainda compreender um ou mais de outros ingredientes ativos, tais como outros agentes os quais são úteis para tratamento de cânceres, em particular câncer de mama ou outros agentes os quais são úteis para tratamento de doenças com as quais a CD166 está associada ou nas quais atividade de CD166 é prejudicial. Agentes ativos adicionais adequados para inclusão em uma composição que tem de ser usada no tratamento de mamífero serão conhecidos por aqueles versados na técnica e podem ser selecionados dependendo da natureza da doença a qual tem de ser tratada pela composição. Agentes adicionais adequados incluem antibióticos os quais se ligam a outros alvos, citocinas, antimetabólitos, agentes de alquilação, análogos de purina e inibidores relacionados, análogos de pirimidina, análogos de ácido fólico, vinca alcaloides, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginase, estrogênios, antiestrogênios, androgênios, antiandrogênios, adrenocorticosteroides, progestinas, supressor adrenocortical, análogos de hormônio de liberação de gonadotropina, interferons, inibidor de topoisomerase, ureia antra-cenodiona-substituída, derivados de metil hidrazina, complexos de coordenação de platina ou agentes químicos e fármacos de controle de efeitos colaterais. Para tratamento de câncer de mama, agentes adicionais adequados poderiam incluir Herceptina, Doxil (Doxorubicina), Avastina ou Taxotero.

Agentes adicionais adequados podem ser selecionados de agentes de indução de apoptose, referidos aqui como "agentes pró-apoptóticos". O agente pró-apoptótico pode ser qualquer agente adequado o qual pode induzir à apoptose e pode, por exemplo, ser um agente de alquilação, um agente de reticulação, um agente de intercalação, um análogo de nucleotídeo, um inibidor da formação de fuso e/ou um inibidor de topoisomerase I e/ou II.

Aqueles versados na técnica estarão cientes de agentes de indução de apoptose adequados mas, à guisa de exemplo, estaurosporina é mencionada aqui.

Vantajosamente, as proteínas de ligação da presente invenção

podem atuar em sinergia com outro agente terapêutico. Por "sinergia" entenda-se que o efeito da proteína de ligação e outro agente, quando administrados em combinação, é maior do que o efeito aditivo da proteína de ligação e do outro agente quando cada um é administrado sozinho como um único agente. A sinergia pode ser em termos de inibição de crescimento celular, indução de apoptose ou citotoxicidade ou qualquer combinação de qualquer um dos antes mencionados. De preferência, ela é em termos da indução de apoptose. Um efeito sinérgico entre uma proteína de ligação da invenção e estaurosporina foi demonstrado no exemplo 8.

Um efeito sinérgico pode resultar em um resultado terapêutico aperfeiçoado. Em algumas modalidades, pode ser permitido o uso de quantidades menores da proteína de ligação e/ou do outro agente, por exemplo, uma quantidade a qual é sub-terapêutica se a proteína de ligação ou outro agente é usado sozinho.

Encarado alternativamente, as proteínas de ligação podem, de preferência, sensibilizar células cancerígenas à apoptose fármaco-induzida.

Um aspecto da presente invenção é, portanto, uma terapia combinada na qual uma proteína de ligação da invenção é usada em conjunto com um agente de indução de apoptose. A proteína de ligação e o agente de indução de apoptose podem ser usados simultânea, sequencial ou separadamente.

Assim, em um outro aspecto, é proporcionado um método de tratamento de câncer compreendendo administração de uma proteína de ligação da invenção e administração separada, simultânea ou sequencial de um agente pró-apoptótico a um indivíduo que precisa do mesmo.

Encarado alternativamente, é proporcionada uma proteína de ligação, conforme definido aqui, para uso em combinação com um agente pró-apoptótico em terapia, por exemplo, no tratamento de câncer.

Assim, é proporcionado o uso da proteína de ligação da invenção na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente pró-apoptótico no tratamento de uma doença, por exemplo, câncer.

Assim, em uma modalidade, o medicamento pode ainda com-

preender um agente pró-apoptótico.

O medicamento pode estar na forma de uma única composição compreendendo a proteína de ligação da invenção e o agente pró-apoptótico ou pode estar na forma de um kit ou produto contendo os mesmos para administração separada.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um produto contendo uma proteína de ligação da invenção junto com um agente pró-apoptótico como um preparado combinado para uso separado, simultâneo ou sequencial em terapia, por exemplo, no tratamento de câncer.

Conforme notado acima, quando a proteína de ligação conforme definido aqui é usada em conjunto com um agente pró-apoptótico, então, os dois agentes diferentes podem estar presentes na mesma composição farmacêutica ou eles podem ser administrados separadamente. Administração separada pode incluir administração substancialmente ao mesmo tempo, mas através de vias de administração diferentes ou através de administração em diferentes locais. Administração separada pode também incluir administração em diferentes momentos, por exemplo, até 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 12 horas de distância.

Doses adequadas da proteína de ligação da invenção e dos outros ingredientes ativos (se incluídos) variarão de paciente para paciente e também dependerão da natureza da doença em particular. De preferência, as referidas dosagens constituem uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilaticamente eficaz, dependendo da natureza do tratamento envolvido. Doses adequadas podem ser determinadas por aqueles versados na técnica ou o médico de acordo com o peso, idade e sexo do paciente e a gravidade da doença. A capacidade da proteína de ligação de estimular uma resposta desejada no indivíduo também será um fator. Doses diárias exemplificativas são: 0,1 a 250 mg/kg, de preferência 0,1 a 200 ou 100 mg/kg, mais preferivelmente 1 a 50 ou 1 a 10 mg/kg do ingrediente ativo. Essa pode ser administrada como uma única dose unitária ou como múltiplas doses unitárias administradas mais de uma vez ao dia. Deve ser notado, contudo, que dosagens apropriadas podem variar, dependendo do paci-

ente e, para qualquer indivíduo em particular, regimes de dosagem específicos deverão ser ajustados com o tempo de acordo com as necessidades individuais do paciente. Assim, as faixas de dosagem apresentadas aqui devem ser consideradas como exemplificativas e não se destinam a limitar o escopo ou prática da composição reivindicada.

Ainda outros aspectos são métodos de diagnóstico ou formação de imagem de um indivíduo compreendendo a administração de uma quantidade apropriada de uma proteína de ligação (por exemplo, conjugado de proteína de ligação) ou outra proteína da invenção, conforme definido aqui, ao indivíduo e detecção da presença e/ou quantidade e/ou localização da proteína de ligação ou outra proteína da invenção no indivíduo.

Doenças apropriadas a serem tratadas, ter a imagem formada ou diagnosticada de acordo com os usos e métodos descritos acima incluem qualquer doença associada à moléculas reconhecidas pelas proteínas da invenção (por exemplo, qualquer doença na qual CD166 está associada ou exerce um papel), em particular câncer (por exemplo, cânceres os quais expressam ou expressam anormalmente CD166), de preferência câncer de mama ou quaisquer outras doenças nas quais CD166 está associada ou exerce um papel, por exemplo, doenças associadas à presença ou superexpressão de CD166 ou onde inibição de atividade de CD166 poderia ser vantajosa.

As proteínas de ligação da invenção se ligam seletivamente a células cancerígenas, de preferência células de câncer de mama e não significativamente a células normais. Portanto, as proteínas de ligação podem ser usadas no diagnóstico, formação de imagem ou terapia de câncer, em particular câncer de mama. Conforme estabelecido acima, os inventores mostraram que as proteínas de ligação da invenção se ligam à CD166. Assim, a especificidade das proteínas de ligação por antígenos tumorais torna as mesmas úteis no diagnóstico, formação de imagem ou terapia de câncer.

Em uma modalidade da invenção, câncer inclui, sem limitação, um ou mais de câncer cervical, câncer uterino, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de rim, câncer de vesícula biliar, câncer de fígado, câncer

de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosas, câncer gastrointes-
tinal, câncer de mama (tal como carcinoma, dutal, lobular e do mamilo), cânc-
cer de próstata, câncer testicular, câncer de pulmão, câncer de pulmão de
5 células não-pequenas, linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, leucemia (tal
como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mie-
logênea crônica e leucemia mielogênea aguda), câncer de cérebro (tal como
astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma), neuroblastoma, sarcomas,
câncer de cólon, câncer do reto, câncer de estômago, câncer anal, câncer
de bexiga, câncer pancreático, câncer endometrial, plasmacitoma, linfomas,
10 retinoblastoma, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, melanoma e outros cân-
ceres de pele. Cânceres preferidos são aqueles os quais mostram expres-
são anormal de CD166, incluindo um ou mais de melanoma, câncer de prós-
tata, câncer de mama, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ovari-
ano, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, câncer esofageal e carcinoma
15 de células escamosas esofageais. Cânceres preferidos são um ou mais de
câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer ovariano,
câncer de cólon, câncer de rim e câncer de cérebro (em particular glioblas-
toma). Cânceres especialmente preferidos são um ou mais de câncer de
mama, câncer de próstata, câncer de pulmão e câncer de rim. Cânceres es-
20 pecialmente preferidos são carcinoma de câncer de mama, câncer de mama
dotal, câncer de mama nodular e câncer de mama do mamilo, com carcino-
ma de mama sendo mais preferido.

Qualquer referência aqui a um "câncer" ou "tumor" deverá ser
entendida como incluindo uma referência a qualquer um dos tipos de câncer
25 listados acima, em particular câncer de mama.

Em uma modalidade preferida, as proteínas de ligação são anti-
corpos ou fragmentos de anticorpo da invenção, o scFv ou Fab ou forma de
IgG sendo especialmente preferidos.

Além disso, células cancerígenas podem ser avaliadas para de-
30 terminar sua suscetibilidade aos métodos de tratamento da invenção, por
exemplo, através de obtenção de uma amostra das células cancerígenas de
um indivíduo e determinação da capacidade das células cancerígenas na

amostra de se ligar às proteínas de ligação da invenção, de preferência anticorpos ou fragmentos de anticorpo.

Consequentemente, a presente invenção inclui métodos diagnósticos, agentes e kits que podem ser usados em si ou antes de, durante
5 ou subsequentemente ao método terapêutico da invenção de forma a determinar se as células cancerígenas, de preferência células de câncer de mama, estão ou não presentes as quais expressam o antígeno e podem se ligar às proteínas de ligação da invenção, de preferência anticorpos e fragmentos de anticorpo.

10 Em uma modalidade, a invenção proporciona um método de diagnóstico de uma doença, de preferência câncer, em um mamífero compreendendo a etapa de:

(1) contato de uma amostra de teste tomada do referido mamífero com qualquer uma ou mais das proteínas de ligação da
15 invenção.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um método de diagnóstico de uma doença, de preferência câncer, em um mamífero compreendendo as etapas de:

(1) contato de uma amostra de teste tomada do referido mamífero com uma ou mais das proteínas de ligação da invenção;
20

(2) medição da presença e/ou quantidade e/ou localização do complexo de proteína de ligação-antígeno na amostra de teste; e, opcionalmente

25 (3) comparação da presença e/ou quantidade de complexo de proteína de ligação-antígeno na amostra de teste com um controle.

Na modalidade acima, o antígeno é CD166.

30 Nos métodos acima, a referida etapa de contato é realizada sob condições que permitem a formação de um complexo de proteína de ligação-antígeno. Condições apropriadas podem ser prontamente determinadas por aqueles versados na técnica.

Nos métodos acima, qualquer amostra de teste apropriada pode ser usada, por exemplo, células de biópsia, tecidos ou órgãos suspeitos de estarem afetados por câncer, seções histológicas ou sangue.

5 Nos métodos acima, a presença da quantidade de um complexo de proteína de ligação-antígeno na amostra de teste seria indicativa da presença de células cancerígenas. Para que um diagnóstico positivo seja feito, em geral, a quantidade de complexo de proteína de ligação-antígeno na amostra de teste é maior do que, de preferência significativamente maior do que a quantidade encontrada em uma amostra de controle apropriada. Mais
10 preferivelmente, os níveis significativamente maiores são estatisticamente significativos, de preferência com um valor de probabilidade $< 0,05$. Métodos apropriados de determinação de significância estatística são bem-conhecidos e documentados na técnica e qualquer um desses pode ser usado.

15 Amostras de controle apropriadas poderiam ser prontamente escolhidas por aqueles versados na técnica, por exemplo, no caso de diagnóstico de uma doença em particular, um controle apropriado seria uma amostra de um indivíduo que não tenha tido essa doença.

20 Amostras de controle apropriadas poderiam ser prontamente escolhidas por aqueles versados na técnica, por exemplo, no caso de diagnóstico de uma doença em particular, um controle apropriado seria uma amostra de um indivíduo que não tenha tido a doença.

25 Para uso em aplicações diagnósticas ou de formação de imagem, as proteínas de ligação da invenção, de preferência anticorpos ou fragmentos de anticorpo, podem ser rotulados com um marcador detectável, tal como um rádio-opaco ou radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; um emissor radioativo (por exemplo, emissores α , β ou γ); um composto fluorescente (fluoróforo) ou quimioluminescente (cromóforo), tal como isocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de armorácia; um agente de
30 formação de imagem; ou um íon de metal; ou uma porção química, tal como biotina, a qual pode ser detectada através de ligação a uma porção cognata

específica detectável, por exemplo, rotulada com avidina/estreptavidina. Conforme descrito acima, métodos de fixação de um rótulo a uma proteína de ligação, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo, são conhecidos na técnica. Tais marcadores detectáveis permitem que a presença, quantidade ou localização dos complexos de proteína de ligação-antígeno na amostra de teste sejam examinadas.

Outro aspecto da invenção é um método de diagnóstico de doença, de preferência câncer, em um mamífero compreendendo as etapas de:

- (1) medição da presença e/ou quantidade de anticorpos da invenção em uma amostra de teste tomada do referido mamífero; e opcionalmente
- (2) comparação da presença e/ou quantidade de anticorpos da invenção na amostra de teste com um controle.

Em uma modalidade, a quantidade de anticorpos da invenção é medida através de medição da quantidade de anticorpos da invenção na amostra de teste, por exemplo, através de ELLISA, por exemplo, usando CD166 como antígeno. Em outra modalidade, a quantidade de anticorpos da invenção é medida medindo-se os níveis de expressão dos ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção na amostra de teste, por exemplo, através de RT-PCR.

A invenção também inclui agentes diagnósticos ou de formação de imagem compreendendo as proteínas de ligação da invenção (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de anticorpo) presos a um rótulo que produz um sinal detectável, direta ou indiretamente. Rótulos apropriados são descritos em alguma parte aqui.

A invenção ainda inclui kits compreendendo uma ou mais das proteínas de ligação ou composições da invenção ou uma ou mais das moléculas de ácido nucleico que codificam as proteínas de ligação da invenção ou um ou mais vetores de expressão recombinantes compreendendo as sequências de ácido nucleico da invenção ou uma ou mais células hospedeiras compreendendo os vetores de expressão recombinantes ou sequências de

ácido nucleico da invenção. De preferência, os referidos kits são para uso nos métodos e usos conforme descrito aqui. A proteína de ligação em tais kits pode, de preferência, ser um conjugado de proteína de ligação conforme descrito em alguma parte aqui, por exemplo, pode ser conjugada a uma porção detectável. De preferência, os referidos kits compreendem instruções para uso dos componentes do kit, por exemplo, em diagnóstico. De preferência, os referidos kits são para diagnóstico de câncer e compreendem, opcionalmente, instruções para uso dos componentes do kit para diagnóstico de câncer.

A invenção ainda inclui um kit para diagnóstico de câncer compreendendo uma ou mais das proteínas de ligação da invenção e, opcionalmente, instruções para uso das mesmas para diagnosticar o câncer. A invenção também inclui um kit para diagnóstico de câncer compreendendo uma proteína de ligação, de preferência um anticorpo ou fragmento de anticorpo conforme descrito aqui, mais preferivelmente um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga à CD166 e opcionalmente instruções para o uso dos mesmos para diagnosticar câncer.

As proteínas de ligação, conforme definido aqui, também podem ser usadas como ferramentas moleculares para aplicações e ensaios *in vitro* ou *in vivo*. Uma vez que as proteínas de ligação têm um sítio de ligação a antígeno, essas podem funcionar como membros de pares de ligação específicos e essas moléculas podem ser usadas em qualquer ensaio onde o membro do par de ligação em particular é requerido. Por exemplo, nas modalidades quando as proteínas de ligação são anticorpos ou fragmentos de anticorpo os quais podem se ligar a antígenos em particular, tal como CD166, essas moléculas podem ser usadas em qualquer ensaio que requer um anticorpo com uma especificidade por esse antígeno em particular, por exemplo, podem ser usadas em qualquer ensaio onde detecção de CD166 é requerida ou desejada.

Assim, outros aspectos da invenção proporcionam um reagente o qual compreende uma proteína de ligação conforme definido aqui e o uso de tais proteínas de ligação como ferramentas moleculares, por exemplo, em

ensaios *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, em ensaios *in vitro* ou *in vivo* para detectar a CD166. Assim, um outro aspecto da invenção proporciona um método de ligação à CD166 compreendendo contato de uma composição contendo CD166 (ou uma molécula compreendendo CD166 ou um fragmento da mesma) com as proteínas de ligação da invenção ou um conjugado das mesmas. A invenção ainda proporciona um método de detecção de CD166 (ou uma molécula compreendendo CD166 ou um fragmento da mesma) compreendendo contato de uma composição suspeita de conter tal molécula de CD166 com as proteínas de ligação da invenção ou um conjugado das mesmas, sob condições eficazes para permitir a formação de complexos de CD166/proteína de ligação e detecção dos complexos assim formados.

CD166 foi relacionada à migração e desenvolvimento celular e à progressão de câncer e expressão anormal de CD166 foi implicada em vários tumores humanos, incluindo melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ovariano, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, câncer de cérebro e carcinoma de células escamosas esofageais.

A despeito do mecanismo, as proteínas de ligação da invenção poderiam ser usadas para modular a sinalização de CD166 envolvida em migração celular, desenvolvimento de câncer ou progressão de câncer.

Consequentemente, a invenção inclui o uso das proteínas de ligação da invenção para modular a atividade de CD166. Por exemplo, as proteínas de ligação da invenção podem ser usadas para interferir com ou inibir a atividade de CD166. As proteínas de ligação da invenção também podem ser usadas para intensificar a atividade de CD166.

Como um exemplo, as proteínas de ligação podem ser usadas para induzir à apoptose de células, conforme exemplificado no Exemplo 8. A indução de apoptose pode ser ensaiada usando Anexina V, conforme descrito no exemplo 8.

A proteína de ligação da invenção pode também ser usada para produzir outras proteínas de ligação as quais são específicas para células

tumorais, por exemplo, células de câncer de mama ou para CD166. Tais usos envolvem, por exemplo, a adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos em uma sequência de aminoácido da proteína de ligação precursora para formar uma nova proteína de ligação, em que a referida proteína de ligação precursora é uma das proteínas de ligação da invenção conforme definido em alguma parte aqui e testagem da nova proteína de ligação resultante para identificar proteínas de ligação específicas para células tumorais ou CD166. Tais métodos podem ser usados para formar múltiplas novas proteínas de ligação as quais podem ser todas testadas com relação à sua capacidade de se ligar a células tumorais ou se ligar à CD166. De preferência, a referida adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos ocorre em um ou mais dos domínios de CDR.

Tal modificação ou mutação em uma proteína de ligação precursora pode ser realizada de qualquer maneira apropriada usando métodos bem-conhecidos e documentados na técnica, por exemplo, realizando métodos de mutagênese aleatória ou dirigida. Se mutagênese dirigida tem de ser usada, então, uma estratégia para identificar resíduos apropriados para mutagênese utiliza a decomposição da estrutura de cristal de um complexo de proteína de ligação-antígeno, por exemplo, o complexo de Ab-Ag, para identificar os resíduos-chave envolvidos na ligação ao antígeno (Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7-12). Subsequentemente, esses resíduos podem sofrer mutação para intensificar a interação. Alternativamente, um ou mais resíduos de aminoácido podem simplesmente ser objetivados para mutagênese dirigida e o efeito sobre a ligação a células tumorais ou CD166 ensaiado.

Mutagênese aleatória pode ser realizada de qualquer forma apropriada, por exemplo, através de PCR propensa a erro, embaralhamento de cadeia ou cepas mutantes de *E. coli*.

Assim, um ou mais dos domínios V_H da invenção podem ser combinados com um único domínio V_L ou um repertório de domínios V_L de qualquer fonte apropriada e as novas proteínas de ligação resultantes testadas para identificar proteínas de ligação específicas para células tumorais ou

CD166. Inversamente, um ou mais dos domínios V_L da invenção podem ser combinados com um único domínio V_H ou um repertório de domínios V_H de qualquer fonte apropriada e as novas proteínas de ligação resultantes testadas para identificar proteínas de ligação específicas para células tumorais ou CD166.

Similarmente, uma ou mais ou, de preferência, todas as três CDRs dos domínios V_H e/ou V_L da invenção podem ser enxertadas em um único domínio V_H e/ou V_L ou um repertório de domínios V_H e/ou V_L conforme apropriado e as novas proteínas de ligação resultantes testadas para identificar proteínas de ligação específicas para células tumorais ou CD166.

Foi mostrado que mutações objetivadas das CDRs, especialmente CDR3 das cadeias pesada e/ou leve, são uma técnica eficaz para aumentar a afinidade do anticorpo e são preferidas. De preferência, blocos de 3 a 4 aminoácidos da CDRs ou regiões específicas denominadas "hot-spots" são objetivados para mutagênese.

"Hot spots" são as sequências em que hipermutação somática ocorre *in vivo* (Neuberger M.S e Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254). As sequências "hot-spot" podem ser definidas como sequências de nucleotídeo de consenso em determinados códons. A sequência de consenso é o tetranucleotídeo RGYW, no qual R pode ser A ou G, Y pode ser C ou T e W pode ser A ou T (Neuberger M.S e Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254). Além disso, os resíduos de serina codificados pelos nucleotídeos AGY estão predominantemente presentes nas regiões CDRs do domínio variável com relação àqueles codificados por TCN, correspondendo a sequências "hot-spot" potenciais (Wagner S.D., Milstein C. e Neuberger M.S. 1995. Codon bias targets mutation. Nature, 376, 732).

Assim, a sequência de nucleotídeo das CDRs das cadeias pesada e leve de cada anticorpo da invenção podem ser exploradas com relação à presença das sequências "hot-spot" e códons AG. Os "hot-spots" identificados das regiões CDR das cadeias leve e pesada podem, então, ser opcionalmente comparadas com as sequências germinativas das cadeias pe-

sada e leve usando o banco de dados International ImMunoGen Tics (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies D.R., Padlan E.A. e Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. Annu. Rev. Biochem. 59, 439-473). Uma sequência, idêntica à linhagem germinativa, sugere que mutação somática
5 ocorreu; portanto, mutações aleatórias podem ser introduzidas imitando os eventos somáticos que ocorrem *in vivo* ou, alternativamente, mutagênese sítio-dirigida pode ser realizada, por exemplo, nos "hot spots" e/ou códons AGY. Em contraste, uma sequência diferente mostra que algumas mutações somáticas já ocorreram. Restará ser determinado se a mutação somática *in*
10 *vivo* foi ótima.

"Hot-spots" preferidos para mutação são aqueles que codificam aminoácidos expostos e, de preferência, aqueles que codificam aminoácidos os quais formam parte dos sítios de ligação a antígeno. Outros "hot-spots" preferidos para mutação são aqueles que codificam aminoácidos não con-
15 servados. Os "hot-spots" que codificam aminoácidos incrustados ou conservados dentro das CDRs, de preferência, não sofrem mutação. Esses resíduos são usualmente críticos para a estrutura global e são improváveis de interagir com o antígeno, uma vez que eles estão incrustados.

Métodos para realização da manipulação acima descrita de amino-
20 noácidos e domínios de proteína são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, as referidas manipulações poderiam, convenientemente, ser realizadas através de engenharia genética a nível de ácido nucleico, em que as moléculas de ácido nucleico codificam proteínas de ligação e domínios apropriados das mesmas são modificados de modo que a sequência de aminoácido da proteína expressa resultante seja, por sua vez, modifi-
25 cada de forma apropriada.

Testagem da capacidade de uma ou mais das novas proteínas de ligação de se ligar especificamente à células tumorais ou CD166 pode ser realizada através de qualquer método apropriado o qual é bem-conhecido e
30 descrito na técnica. Células tumorais, por exemplo, linhagens de célula de carcinoma de mama, estão amplamente disponíveis (veja os exemplos) e essas ou CD166, a qual está comercialmente disponível, por exemplo, da

R&D Systems, podem ser prontamente usadas para ensaiar a ligação, por exemplo, através de métodos convencionais, tais como ELISA, cromatografia por afinidade, etc.

5 As novas proteínas de ligação produzidas através desses métodos terão, de preferência, uma afinidade maior ou intensificada (ou pelo menos uma afinidade equivalente) por células tumorais ou CD166 do que a proteína de ligação precursora e podem ser tratadas e usadas da mesma forma que as proteínas de ligação da invenção, conforme descrito em alguma parte aqui (por exemplo, para terapia, diagnóstico, em composições, etc.).

10 Novas proteínas de ligação produzidas, obtidas ou obteníveis através desses métodos formam um outro aspecto da invenção.

Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir da descrição detalhada acima. Deverá ser entendido, contudo, que a descrição detalhada acima e os exemplos específicos a
15 seguir, embora indicando modalidades preferidas da invenção, são fornecidas à guisa de ilustração apenas, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e escopo da invenção se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição detalhada.

A invenção será agora descrita em maiores detalhes nos exemplos não-limitativos a seguir com relação às tabelas e figuras, nas quais:

A tabela 1 lista algumas das sequências descritas aqui.

A tabela 2 mostra as regiões de estrutura do clone EJ212/007-CI2-5 (scFv) (de acordo com Kabat).

25 A tabela 3 mostra o método de classificação por IHC usado para amostras de tecido humano.

A tabela 4 mostra dados de IHC para o clone EJ212/007-CI2-5 (scFv).

A tabela 5 mostra dados de IHC para o clone de IgG EJ212/007-CI2-5 sobre alguns tecidos humanos normais e tecidos de tumores correspondentes.
30

A tabela 6 mostra a lista do exemplo 10 de peptídeos usados para caracterização de perfil de massa que foram equivalentes à proteína

CD166.

A figura 1 mostra a sequência de aminoácido e nucleotídeo, *inter alia*, as cadeias pesada e leve do clone scFv EJ212/007-C12-5. ScFv foram clonados via o sítio NcoI/NotI no pHOG21 (3,7 Kb). Os sítios de restrição
5 usados para a clonagem inicial (NcoI, HindIII, MluI e NotI) estão em itálico e sublinhados. A sequência ligante entre o V_H e V_L está em itálico. Os epítomos de c-myc e 6 His estão sublinhado e duplamente sublinhado, respectivamente.

A figura 2 mostra os resultados de citometria de fluxo do exemplo 2. A figura 2A mostra a ligação de EJ212/007-C12-5 a células MDA-MB 231, a figura 2B mostra que não há ligação ou há ligação insignificante a PBLs e a figura 2C mostra que não há ou há ligação insignificante a granulócitos. A figura 2D mostra ligação de EJ212/007-C12-5 a células SW900.

A figura 3 mostra os resultados de afinidade do exemplo 3, mostrando a curva de saturação de EJ212/007-C12-5 na figura 3A e plotagem de Lineweaver-Burk de EJ212/007-C12-5 na figura 3B. A figura 3C mostra os resultados de análise por Biacore da afinidade de ligação de fragmentos Fab de EJ212/007-C12-5. As curvas de ligação são mostradas na figura 3C e o valor de K_d foi medido como $2,9 \times 10^{-8}$ M para o Fab EJ212/007-C12-5.

A figura 4 mostra os resultados de citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) pela IgG EJ212/007-C12-5 do exemplo 5. A figura mostra que EJ212/007-C12-5 é capaz de induzir à ADCC de células PM-1, enquanto que o anticorpo de controle negativo não mostra um efeito citotóxico. As barras de erro representam os desvios padrão calculados a partir de
25 quadruplicatas usadas para cada amostra. Amostras de Triton X-100 mostram os níveis máximos de citotoxicidade.

A figura 5A mostra o vetor de expressão de scFv, pHOG21. ApR, gene de resistência à ampicilina; ColE1, origem de replicação de DNA; flIG, região intergênica do fago f1; c-myc, epítipo reconhecido pelo anticorpo
30 monoclonal 9E10; His6, seis resíduos de histidina; pelB, peptídeo sinalizador de liase de pectato bacteriana; P/O, operador do promotor lac do tipo silvestre. A figura 5B mostra as sequências de aminoácido e nucleotídeo da região

de codificação C-terminal.

A figura 6 mostra a intensidade média de fluorescência de células CFSE-rotuladas do exemplo 6 após 7 dias de incubação na presença de IgG EJ212/007-CI2-5 comparado com células CFSE-rotuladas incubadas sem IgG. Quanto maior a intensidade de fluorescência, menos divisão celular é observada, assim, uma maior intensidade de fluorescência é indicativa de inibição do ciclo celular pelo anticorpo.

A figura 7A mostra a internalização, no exemplo 7, de scFv EJ212/007-CI2-5 em células PM-1 após 30 minutos de incubação a 37 °C. A figura 7B mostra o controle positivo para internalização.

A figura 8A mostra a viabilidade celular reduzida após incubação de células BT474 com IgG EJ212/007-CI2-5 na presença de Estaurosporina. A figura 8B mostra a coloração positiva para Anexina V de células BT474 do exemplo 8 após incubação com IgG EJ212/007-CI2-5 na presença de Estaurosporina.

A figura 9 mostra os resultados de tratamento da IgG EJ212/007-CI2-5 de camundongos trazendo MDA-MB 231 do exemplo 9. Os resultados são visualizados como o número de camundongos com tumores pesando menos de 4 gramas após injeção do anticorpo. A figura mostra que a IgG EJ212/007-CI2-5 reduziu o crescimento do tumor comparado com os tumores do grupo de controle que receberam PBS.

A figura 10 mostra a análise por Western blot do exemplo 10 com IgG EJ212/007-CI2-5 sobre a fração de membrana e citosólica (antes e após concentração) de células PM-1 e DU-145. Uma banda clara para o antígeno EJ212/007-CI2-5 potencial é observada na fração de membrana purificada após concentração, conforme indicado pela seta.

A figura 11 mostra a análise por Western blot do exemplo 10 da proteína capturada com IgG EJ212/007-CI2-5 de células PM-1. A banda indicada para o antígeno EJ212/007-CI2-5 foi excisada e usada para análise por espectrometria de massa dos peptídeos digeridos.

A figura 12 mostra a lista do exemplo 10 de peptídeos usados para caracterização de perfil de massa e sua posição mapeada com relação

à sequência sobre a proteína CD166.

A figura 13 mostra a análise por Western blot do exemplo 10 da proteína covalentemente ligada com scFv EJ212/007-CI2-5 de células PM-1.

A figura 14 mostra a análise por Western blot do exemplo 10 da
 5 proteína covalentemente ligada com scFv EJ212/007-CI2-5 de células PM-1. A banda indicada para EJ212/007-CI2-5 foi excisada e usada para análise por espectrometria de massa dos peptídeos digeridos.

A figura 15 mostra a ligação, em ELISA, de IgG EJ212/007-CI2-5 ao domínio extracelular completo da CD166 (CD166-Fc), domínio extracelu-
 10 lar de 1 a 5 (CD166 d1-5/Fc) e domínio extracelular de 1 a 3 (CD166 d1-3/Fc) do exemplo 11. Os domínios extracelulares de CD166 foram expressos como quimeras de Fc recombinantes.

Os exemplos não limitativos a seguir são ilustrativos da presente invenção.

15 **EXEMPLOS**

Exemplo 1: Novo anticorpo.

Dada a necessidade por anticorpos tumor-específicos, um anti-
 corpo humano foi identificado, o qual é reativo contra células tumorais PM-1
 de carcinoma de mama (fornecidas pelo DNR, Department of Tumorbiology)
 20 e negativo contra PBL (linfócitos de sangue periférico) e granulócitos. O anti-
 corpo pode se ligar especificamente à CD166. A forma de cadeia única do
 anticorpo foi clonada no plasmídeo pHOG21 (nos sítios de restrição NcoI e
 Not I) os quais contêm epítomos de tag c-myc e 6xHis. Células de *E. coli* XL-
 1 blue foram transformadas, selecionadas sobre lâminas com ampicilina e o
 25 scFv foi expresso quando de indução com IPTG. ScFv purificado foi testado
 através de ELISA de células com relação à atividade biológica seletiva com
 PM-1 versus PBL e granulócitos. A atividade biológica seletiva foi ainda con-
 firmada através de citometria de fluxo sobre os mesmos tipos de célula mais
 outras linhagens de célula de carcinoma de mama.

30 **Sequenciamento**

As sequências de nucleotídeo das cadeias pesada e leve do an-
 ticorpo que produzem clone foram sequenciadas. O anticorpo é designado

como EJ212/007-CI2-5 (scFv). A sequência de nucleotídeo e sequência de aminoácido das cadeias pesada e leve de EJ212/007-CI2-5 (scFv) são mostradas na figura 1. As regiões de CDR das cadeias leve e pesada de EJ212/007-CI2-5 são mostradas na Tabela 1.

5 A forma de IgG desse anticorpo também foi feita. A forma de IgG é do isotipo IgG1 e compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada cadeia pesada compreende um domínio V_H de SEQ ID NO: 9 e uma região constante de IgG1. Cada cadeia leve compreende um domínio V_L de SEQ ID NO: 10 e uma região constante leve kappa. Os componentes
10 da forma de IgG do anticorpo foram clonados em vetores baseado em um vetor publicado por Lars Norderhaug et al., JIM 204 (1997) 77-87 e usando o método descrito nessa referência. O vetor contém um promotor de CMV padrão. Uma sequência líder de IgG (mgwsciilflvatatgvhs) foi introduzida em cada vetor. Os domínios V_H e V_L foram clonados em vetores distintos con-
15 tendo cópias genômicas (íntrons + éxons) dos genes de IgG1 e Kappa humanos, respectivamente, nos sítios BsmI e BSIWI, os quais tinham sido introduzidos através de PCR. O vetor para IgG1 contém um gene de resistência à neomicina, enquanto que o vetor para Kappa contém um gene de resistência à higromicina.

20 Outros anticorpos scFv os quais podem se ligar especificamente à CD166 também foram gerados.

Exemplo 2: especificidade de EJ212/007-CI2-5 através de citometria de fluxo (FACS e Guava Easy Cyte).

Para determinar a especificidade tumoral do anticorpo, ligação de
25 EJ212/007-CI2-5 foi testada através de citometria de fluxo (FACS, B&D e Guava EasyCyte, Guava Technologies) sobre PBLs e granulócitos e sobre a linhagem de célula de carcinoma de mama MDA-MB231 (ATCC: HTB-26). Resumidamente, $1,2 \times 10^5$ células/100 μ l foram incubadas com 10 μ g/ml de scFv EJ212/007-CI2-5 purificado ou PBS. O scFv ligado foi detectado com
30 um anticorpo monoclonal de camundongo anti-tag c-myc (Invitrogen), seguido por uma IgG anticamundongo FITC-rotulada (DAKO).

Os resultados de citometria de fluxo mostraram forte ligação de

EJ212/007-CI2-5 à MDA-MB 231 (figura 2A), mas nenhuma ou ligação insignificante a PBL ou granulócitos (figuras 2B e C, respectivamente).

A ligação à linhagem de célula de carcinoma de pulmão SW900 (ATCC: HTB-59) também foi testada e a figura 2D mostra ligação de EJ212/007-CI2-5 à células SW900.

Exemplo 3: afinidade de ligação de EJ212/007-CI2-5.

Citometria de fluxo foi usada para avaliar a afinidade de ligação do anticorpo EJ212/007-CI2-5 a células tumorais. Concentrações aumentadas do scFv foram testadas contra um número fixo de células SW900 (ATCC: HTB-59), uma linhagem de célula de câncer de pulmão humana, para estabelecer uma curva de saturação. O scFv ligado foi detectado conforme descrito acima. A afinidade de ligação, expressa como a K_m , foi calculada através do método de Lineweaver-Burk plotando o inverso da fluorescência média como uma função do inverso da concentração molar de anticorpo. A K_m foi determinada através da seguinte equação: $K_m = F_{Max} * a$, em que 'a' corresponde ao declínio da curva e $F_{Max} = 1/b$ foi calculado a partir da plotagem ($y = ax + b$).

As curvas de ligação e plotagens de Lineweaver-Burk são mostradas nas figuras 3A e B e o valor de K_m foi calculado como $2,1 \times 10^{-8}$ M para o anticorpo EJ212/007-CI2-5.

A afinidade de ligação de fragmentos Fab de EJ212/007-CI2-5 ao antígeno CD166 foi medida através de análise Biacore. ALCAM/Fc recombinante (250 RU) foi imobilizada, através de acoplamento com amina, a uma lasca CM5. Uma faixa de concentrações do anticorpo Fab, de 3,9 a 125 nM (nanomolar), foi passada sobre a lasca. As curvas de ligação são mostradas na figura 3C. A afinidade de ligação, expressa como a K_d , foi calculada usando o modelo de ligação a ligante heterogêneo no software Biacore T100 Evaluation. O valor de K_d obtido para o Fab EJ212/007-CI2-5 foi de $2,9 \times 10^{-8}$ M.

Exemplo 4: seletividade e especificidade de EJ212/007-CI2-5 sobre seções teciduais humanas.

A seletividade do anticorpo scFv EJ212/007-CI2-5 foi determina-

da por sua ligação a tecidos tumorais humanos usando coloração imuno-histoquímica. O anticorpo foi primeiro testado contra péletes congelados da linhagem de células SW900 para definir as condições ótimas para coloração. O anticorpo foi, então, testado sobre um arranjo de alta densidade de tecidos de tumor humano, incluindo mama, próstata e rim de 11 a 14 doadores diferentes. A intensidade de coloração da membrana foi estimada através de inspeção visual em uma escala de quatro etapas (0, 1, 2, 3). Além disso, a fração de células tumorais com coloração positiva foi estimada. Um escore de IHC final foi construído a partir desses dois parâmetros, de acordo com a tabela 3.

Os resultados são resumidos na tabela 4. Positividade para EJ212/007-CI2-5 foi encontrada em 20 (51%) tumores.

A ligação mais forte foi observada com, mas não limitado a, mama, rim e próstata, com um escore mais alto em 2+ e um percentual global de células positivas maior do que 50%. Em todos os casos, coloração do citoplasma com escore 1+ foi observada.

A especificidade do anticorpo scFv EJ212/007-CI2-5 foi determinada comparando a ligação a um microarranjo de tecido com 13 tecidos de tumor de mama humano e com um microarranjo de tecidos com 4 tecidos normais de mama usando coloração imuno-histoquímica. A coloração foi realizada conforme descrito acima para testagem de seletividade.

O anticorpo scFv EJ212/007-CI2-5 mostrou coloração membrana-específica evidente de 6/13 tecidos tumorais, enquanto que nenhuma coloração membrana-específica de tecido de mama normal foi observada.

A especificidade da IgG EJ212/007-CI2-5 foi testada sobre grandes seções teciduais de 4 tecidos de cérebro e 4 de ovário humano normais, bem como 6 tecidos de tumor de cérebro humano (glioblastoma) e 6 de tumor de ovário humano. Coloração foi realizada conforme descrito acima para testagem de seletividade. Em contraste à forma de scFv, a forma de IgG do anticorpo mostrou coloração membrana-específica evidente do tecido de tumor de mama e tecido de mama humana normal.

Os resultados para IgG EJ212/007-CI2-5 são sumarizados na

tabela 5. O anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5 mostrou coloração membrana-específica evidente de 1/3 dos tecidos de tumor cerebral e 6/6 tecidos de tumor de ovário, enquanto que nenhuma coloração membrana-específica de tecido normal de cérebro e ovário foi observada.

5 O anticorpo IgG também foi testado com relação à reatividade cruzada com tecido de camundongo. Ele mostrou ligação com reatividade cruzada com tecido normal de pulmão, próstata, estômago de camundongo, enquanto que cérebro, cólon, coração, testículo, fígado e ovário normais de camundongo não mostraram coloração membrana-específica.

10 **Exemplo 5: citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC).**

Para investigar a capacidade do EJ212/007-CI2-5 de induzir à ADCC, o anticorpo foi clonado no formato de IgG e incubado com células tumorais humanas na presença de linfócitos de sangue periférico (PBL) humanos recentemente isolados. As células tumorais humanas foram selecionadas de células de tumor de mama (PM-1, MDA-MB 231 e BT474), células de tumor de pulmão (SW900 e A-549) ou células de tumor de próstata (DU-145). A finalidade desse teste é determinar a utilidade do anticorpo candidato para aplicação terapêutica usando o anticorpo como IgG nua.

Em suma, células PM-1, MDA-MB 231, BT474, SW900, A-549 ou DU-145 foram coletadas com tripsina/EDTA. Após lavagem das células uma vez com RPMI/FCS a 10% e uma vez com RPMI sem soro, as células tumorais foram rotuladas com calceína (calceína-acetometil éster, Invitrogen). $1,5 \times 10^4$ células tumorais rotuladas foram misturadas com 3×10^5 PBLs recentemente isolados e $1 \mu\text{g/ml}$ de anticorpo IgG. No ensaio, uma proporção de célula efetuidora (PBL) para célula-alvo (PM-1, MDA-MB 231, BT474, SW900, A-549 ou DU-145) de 20:1 foi usada e todas as amostras foram testadas em quadruplicatas. Triton X-100 foi adicionado até 0,8% nas amostras com liberação máxima. Todas as amostras foram incubadas durante 4 horas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO_2 . 100 μl de sobrenadante foram, então, analisados em um leitor de fluorescência para lâmina (comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm).

A figura 4 mostra que a adição do anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5 à mistura de células tumorais/PBL resultou em morte de aproximadamente 20% das células tumorais (células de tumor de mama PM-1). A adição de um anticorpo IgG de controle negativo não mostrou morte, demonstrando a especificidade de morte induzida pela IgG EJ212/007-CI2-5. Os números foram calculados subtraindo da fluorescência de base (incubação de células efetadoras e alvo sem a adição de anticorpo IgG) e corrigidos para a redução de fluorescência (aprox. 20%) nas amostras com liberação máxima que é observada em virtude da adição de Triton X-100. Experimentos de ADCC com outras linhagens de célula tumoral mostraram morte de aproximadamente 10% das células de tumor de pulmão (SW900 e A-549), aproximadamente 5 e 30% das células de tumor de mama (MDA-MB 231 e BT474, respectivamente) e aproximadamente 3% das células de tumor de próstata (DU-145). A eficiência de morte variou com cada doador de PBL.

Exemplo 6: inibição de crescimento.

A IgG EJ212/007-CI2-5 foi testada com relação ao potencial inibitório sobre a linhagem de células de carcinoma de mama MDA-MB 453 (ATCC: HTB-131) CFSE-rotulada. CFSE tem uma fluorescência brilhante e é dividido igualmente entre células-filha com cada divisão. Isso permite coloração diferencial de populações de célula. Populações nas quais divisão celular foi inibida exibirão maior fluorescência do que populações as quais foram deixadas dividir livremente. Em outras palavras, a inibição de divisão celular causa uma redução menos acentuada na fluorescência.

2×10^6 células foram rotuladas com CFSE a 0,625 μ M durante 15 minutos a 37°C. Após lavagem, as células foram divididas em seis frascos de cultura de célula T75 e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ na presença de 10 μ g/ml de IgG EJ212/007-CI2-5. Incubação sem qualquer anticorpo foi usada como um controle. O meio de cultura de célula foi trocado dia sim, dia não com meio fresco e anticorpo. Após 7 dias de cultura, as células foram coletadas com tripsina-EDTA, lavadas e transferidas para uma lâmina com 96 cavidades. Após adição de iodeto de propídio, a fluorescência das células foi medida usando o Gauva EasyCyte.

A figura 6 mostra a intensidade média de fluorescência após 7 dias de cultura. Células que foram incubadas na ausência de anticorpo (células CFSE 453) mostram uma intensidade de fluorescência menor do que as células incubadas com o anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5. Isso mostra
5 que as células se dividem menos na presença do anticorpo EJ212/007-CI2-5 e que o anticorpo tem um efeito inibitório de crescimento.

Exemplo 7: internalização.

O anticorpo scFv EJ212/007-CI2-5 foi testado com relação à internalização sobre células PM-1 com o uso de um anticorpo secundário Cy-
10 pHer5E-rotulado. CypHer5E® é um derivado de corante de cianina vermelho-excitável, sensível ao pH o qual é minimamente fluorescente em um pH básico e maximamente fluorescente em um pH ácido. Portanto, ele é idealmente adequado para reportar o movimento de um receptor da superfície celular para endossomas ácidos quando de estimulação com agonista. Para
15 o ensaio de internalização, 2×10^5 células foram adicionadas por cavidade de uma lâmina com paredes pretas de 96 cavidades (Applied Biosystems). Após adição de 2,5 µg/ml de IgG anti-c-myc Cypher5E-rotulada (9E10, Dia-
tec), as células foram incubadas durante 30 minutos a 37°C na presença de 5 µg/ml de scFv EJ212/007-CI2-5. Como um controle, as células foram incu-
20 badas com um anticorpo de controle positivo, o qual é conhecido por ser internalizado. Após centrifugação durante 3 minutos a 100 g, a fluorescência dentro das células foi medida com o 8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems).

O anticorpo secundário CypHer5E-rotulado foi detectado após
25 incubação na presença de scFv EJ212/007-CI2-5, indicando alguma internalização do scFv EJ212/007-CI2-5 (vide figura 7A). A figura 7B mostra coloração na presença do anticorpo de controle positivo.

Exemplo 8: apoptose.

Com o objetivo de avaliar a atividade do anticorpo IgG
30 EJ212/007-CI2-5 como um indutor de apoptose, estudou-se seu efeito sobre a linhagem de célula de câncer de mama BT474 (ATCC HTB-20). Para essa finalidade, investigou-se sua atividade (por meio de coloração com Anexina

V - Anexina V é rotulada com FITC) apenas e em combinação com um inibidor de proteína quinase e indutor de apoptose bem-conhecido, Estaurosporina. 2×10^5 células foram colocadas em uma lâmina com 6 cavidades 24 horas antes de adição dos fármacos. As células, junto com fármacos, foram incubadas durante mais 24 horas e o efeito, após coleta das células e coloração com Anexina V (100.000 células), foi medido através de análise por FACS (EasyCyte). O anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5 foi testado em concentrações de 30 $\mu\text{g/ml}$ 25, 20, 10 e 5 $\mu\text{g/ml}$ em combinação com Estaurosporina a 0,1 μM e o anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5 apenas na maior concentração (30 $\mu\text{g/ml}$). Os controles internos usados foram Estaurosporina a 0,1 μM ou DMSO (0,005%). Para avaliar a viabilidade celular após incubação com os fármacos, iodeto de propídio (1:4000; coloração de células mortas) foi adicionado na etapa final de coloração com Anexina V.

A figura 8B mostra que há alguma indução de apoptose pelo anticorpo IgG EJ212/007-CI2-5 apenas e alguma indução pela Estaurosporina apenas. O efeito de IgG EJ212/007-CI2-5 em combinação com Estaurosporina é maior do que os efeitos combinados de cada agente individual, indicando um efeito sinérgico. A viabilidade celular, conforme mostrado na figura 8A é, conforme esperado, inversamente proporcional à indução de apoptose.

Exemplo 9: eficácia *in vivo*.

Para testar o efeito da IgG EJ212/007-CI2-5 sobre o crescimento de células tumorais *in vivo*, 30 camundongos nus fêmeas (nu/nu atímicos) foram subcutaneamente implantados com fragmentos de tumor MDA-MB 231 e aleatoriamente atribuídos a 2 grupos de tratamento. Cada grupo foi tratado intravenosamente via a cauda com controle de veículo (PBS; 3 injeções, a cada sete dias) ou IgG EJ212/007-CI2-5 (100 mg/kg de peso corporal; 3 injeções, a cada sete dias).

Os tumores foram medidos três vezes por semana. Camundongos individuais foram selecionados para sacrifício quando o tumor atingiu o critério de término predeterminado de 4 gramas (igual a 4000 mm^3).

A figura 9 mostra o percentual de camundongos com tumores de

menos de 4 gramas após injeção de PBS ou IgG EJ212/007-CI2-5. O grupo de animais tratados com IgG EJ212/007-CI2-5 mostrou crescimento reduzido do tumor comparado com o grupo tratado com PBS: o grupo tratado com EJ212/007-CI2-5 tinha um maior percentual de camundongos com tumores de menos de 4 gramas entre 20 e 35 dias após injeção do que o grupo tratado com PBS.

Exemplo 10: caracterização do antígeno EJ212/007-CI2-5.

Caracterização do antígeno do anticorpo EJ212/007-CI2-5 foi obtida usando dois métodos diferentes: imunoprecipitação e ligação cruzada.

10 **Método 1: Imunoprecipitação**

Proteínas da membrana foram isoladas de duas linhagens de célula positivas para o antígeno EJ212/007-CI2-5 (PM-1 e DU-145; determinado através de análise por FACS) e concentradas através de ultracentrifugação. As membranas foram resuspensas em detergente (CHAPS/DOC) o qual foi, então, removido da amostra usando Resina de Remoção de Detergente (Pierce) no formato de coluna. As proteínas da membrana purificadas antes e após concentração da amostra e a fração citosólica foram subsequentemente analisadas através de SDS-PAGE/Western sob condições de não-redução. A blot foi hibridizada com a IgG EJ212/007-CI2-5 e IgG anti-humana secundária acoplada à HRP correspondente de forma a visualizar as proteínas através de quimioluminescência.

A banda evidente (>62 KDa) na figura 10 mostra que o antígeno EJ212/007-CI2-5 está presente na amostra de membrana purificada.

Captura do antígeno foi obtida através de imunoprecipitação. A IgG EJ212/007-CI2-5 foi covalentemente ligada a glóbulos CarboLink® (Pierce) através de grupos anticorpo sobre o domínio Fc, enquanto deixada os sítios de ligação de antígeno desobstruídos. Como um controle positivo, uma IgG a um antígeno conhecido foi ligada a uma amostra distinta de glóbulos. As proteínas extraídas da membrana foram passadas sobre os glóbulos em um formato de coluna e os antígenos que se ligaram ao anticorpo foram eluídos e analisados através de SDS-PAGE/Western sob condições de não-redução.

As duas primeiras fileiras na figura 11 mostram as bandas do antígeno de controle positivo capturado. A fileira 3 mostra uma banda entre 83 e 175 KDa de material que foi eluído dos glóbulos EJ212/007-CI2-5-ligados. Essa banda foi excisada de um gel de SDS-PAGE de não-redução após coloração com SyproRuby e digerida com tripsina para subsequente análise dos peptídeos extraídos através de espectrometria de massa.

Todos os peptídeos recuperados e reconstruídos para suas massas corretas foram usados diretamente em uma etapa de caracterização de perfil de massa de peptídeo para obter um ID para a proteína. A lista de peptídeos usados para identificação e suas posições mapeadas com relação à sequência de MEMD (gi|3183975), idêntica à ALCAM (molécula de adesão celular leucócito-ativada; CD166), são mostradas na figura 12.

Método 2: ligação cruzada.

scFv EJ212/007-CI2-5 (His-tagged) com uma cisteína introduzida através de mutação de ponto na posição 68 (Kabat, RFCIS) foi expresso em *E. coli* TG1 e purificado na presença de ditioneitol a 1 mM. O scFv EJ212/007-CI2-5 T68C resultante foi, então, incubado com um excesso do ligante Mts-Atf-LC-Biotina (Pierce, Prod. No 33083), um ligante com três braços, com os seguintes grupos sobre cada braço: biotina (sobre o braço clivável através de reagente de redução), grupo reativo não-específico fotoativável e grupo aminorreativo. O scFv com ligante foi, então, dessalinizado e armazenado em PBS.

Células PM-1 (2×10^6) foram incubadas com 25 μ g do scFv acoplado ao ligante acima. Após lavagem com PBS, as células foram expostas à luz UV a 302 nm. Isso foi seguido por lise das células com NP-40 na presença de DNaseI. Após incubação sobre gelo, SDS foi adicionado e as amostras foram carregadas sobre uma His-coluna. A coluna foi lavada na presença de NP-40 e SDS e a proteína de interesse foi eluída com DTT a 5 mM nos mesmos detergentes. A amostra eluída foi, então, misturada com glóbulos de estreptavidina e os glóbulos foram lavados na presença de SDS. As concentrações de SDS foram aumentadas e os glóbulos foram incubados a 90°C durante cinco minutos. O sobrenadante foi, então, passado sobre

SDS-PAGE a 7%, transferido para uma membrana de PVDF e detectado com estreptavidina-HRP.

A figura 13 mostra uma banda evidente de >75 KDa que representa o antígeno EJ212/007-CI2-5. O mesmo experimento foi repetido com
5 67 x 10⁶ e 75 µg de scFv com ligante. Um terço da amostra eluída dos glóbulos foi passada sobre SDS-PAGE a 7% e colocadas sobre uma membrana de PVDF, conforme descrito acima (figura 14). A amostra restante foi passada sobre SDS-PAGE a 7% e corada com SyproRuby. A banda de interesse, conforme indicado na figura 14, foi cortada do gel e enviada para análise de
10 espectrografia de massa (tabela 6). Peptídeos relevantes identificados no relatório de espectrometria de massa foram atribuídos à ALCAM (CD166).

Exemplo 11: ligação de EJ212/007-CI2-5 ao antígeno identificado.

Dois construtos consistindo no domínio de 1 a 3 (CD166 d1-3/Fc) ou domínio de 1 a 5 (CD166 d1-5/Fc) do antígeno CD166 foram clonados no vetor pLNO-Fc-Hyg-IgG. Cada construto foi expresso em células
15 HEK através de transfecção. Após quatro dias de expressão, o meio foi coletado e CD166 d1-3/Fc e CD166 d1-5/Fc foram purificados com cromatografia por afinidade, proteína A e submetidos à diálise durante a noite em PBS.

Ligação da IgG EJ212/007-CI2-5 ao antígeno CD166 foi testada
20 em ELISA. Uma lâmina para ELISA foi revestida durante a noite com 10 µg/ml de um antígeno CD166-Fc recombinante comercialmente disponível (R&D Systems), CD166 d1-5/Fc ou CD166 d1-3/Fc. Uma IgG com especificidade de ligação irrelevante foi adicionada ao ELISA como um controle negativo. Após lavagem com PBS/Tween a 0,05%, a lâmina foi incubada durante
25 1 hora com uma série de diluições de IgG EJ212/007-CI2-5, oscilando de 10 a 0,16 µg/ml. Detecção da IgG ligada foi feita através de incubação durante 1 hora com 1 µg/ml de anti-kappa-HRP e 15 minutos com o substrato 1-Step ABTS (Pierce). A absorbância foi medida a 405 nm.

A figura 15 mostra a ligação de IgG EJ212/007-CI2-5 ao CD166-Fc recombinante, CD166 d1-5/Fc e CD166 d1-3/Fc, indicando que o epítopo
30 de scFv de EJ212/007-CI2-5 está localizado sobre o domínio 1-3 do antígeno CD166.

A ligação de IgG EJ212/007-CI2-5 a CD166-Fc recombinante de camundongo (R&D Systems) foi mostrada em um ELISA similar, conforme descrito acima para CD166-Fc humano.

Tabela 1

SEQ ID NO	Descrição	Sequência
1	EJ212/007-CI2-5, na	Figura 1
2	EJ212/007-CI2-5, pp	Figura 1
3	EJ212/007-CI2-5, CDR1 VH pp	SYAMS
4	EJ212/007-CI2-5, CDR2 VH pp	AISGSGGSTYYADSVKG
5	EJ212/007-CI2-5, CDR3 VH pp	GGGVVEF
6	EJ212/007-CI2-5, CDR1 VL pp	RASQDISSYFA
7	EJ212/007-CI2-5, CDR2 VL pp	AATLRS
8	EJ212/007-CI2-5, CDR3 VL pp	QQSYSTPRIT
9	EJ212/007-CI2-5, V _H pp	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCARGGGVVEFWGQGTLVTVSS
10	EJ212/007-CI2-5, V _L pp	DIRMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQDISSY FAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT RSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PRITFGQGRLEIK
11	pp lider de IgG	MGWSCIIILFLVATATGVHS
12	pp de região constante de IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	pp Kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
14	EJ212/007-CI2-5, V _H na	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCCGGGGGAG GCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGTACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG AGGGGGGAGGAGTGGTGAATTTTGGGG CCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCCTCA (veja figura 1)

continuação

15	EJ212/007-C12-5, VL na	GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTTC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGACATTA GCAGTTATTTTCGCCTGGTATCAGCAAAAAC CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATG CTGCATCCACTTTGCGAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAAC TTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCC TCGGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAAA (veja figura 1)
----	------------------------	--

Tabela 2

VH	Estrutura 1	Estrutura 2
EJ212/007-C12-5	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	WVRQAPGKGLEWVS
VH	Estrutura 3	Estrutura 4
EJ212/007-C12-5	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGLTVTVSS
VL	Estrutura 1	Estrutura 2
EJ212/007-C12-5	DIRMTQSPSFLSASVGDRVITTC	WYQQKPGKAPKLLIY
VL	Estrutura 3	Estrutura 4
EJ212/007-C12-5	GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC	FGQGTRLEIK

Tabela 3

Escore de IHC

Escore	Definição
Negativo	Int* 0
Fraco	Int 1 Int 2 em $\leq 70\%$ das células tumorais Int 3 em $\leq 30\%$ das células tumorais
Forte	Int 2 em $> 70\%$ das células tumorais Int 3 em $> 30\%$ das células tumorais

*Int = intensidade de coloração.

5 **Tabela 4**

Arranjo de tumor de alta densidade para scFv EJ212/007-C12-5

Tecido	Coloração de membrana	Faixa de escore
Mama	6/13	Fraco (3) e forte (3)
Próstata	9/11	Fraco (6) e forte (3)
Rim	5/14	Fraco (3) e forte (2)

Os números entre parênteses indicam o número de pacientes mostrando escore 2+.

Tabela 5

Coloração de membrana de grandes seções teciduais de tecidos humanos normais e tecidos tumorais correspondentes com IgG EJ212/007-CI2-5.

Tecido	Normal	Tumor
Cérebro	0/4	1/3
Ovário	0/4	6/6

5 **Tabela 6**

Query	308	393	395	403
Observado	512,4489	897,9930	901,3573	755,0889
Mr (esp.)	1534,3248	2690,9572	2701,0501	3016,3266
Mr (calc.)	1533,9283	2690,3585	2700,3006	3015,5593
Delta	0,3966	0,5986	0,7495	0,7673
Faltando	0	0	0	0
Escore	64	103	65	65
Esperado	0,00022	1,5e-08	9,4e-05	0,00011
Classificação	1	1	1	1
Peptídeo	K.VLHPLEGAVIIF K.K	K.SMIASITVHYLD LSLNPSGEVTR.Q + Oxidação (M)	K.CLGNGNPPPE EFLFYLPQGPEGI R.S	K.TIHSEQAVF DIYYPTEQVTI QVLPPK. N

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação compreendendo:

- 5 (i) um ou mais domínios de CDR de cadeia pesada, em que o domínio de CDR de cadeia pesada é selecionado do grupo consistindo em:
- (a) um domínio de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma;
- 10 (b) um domínio de CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e
- (c) um domínio de CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 3 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e/ou
- 15 (ii) um ou mais domínios de CDR de cadeia leve, em que o domínio de CDR de cadeia leve é selecionado do grupo consistindo em:
- (d) um domínio de CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma;
- 20 (e) um domínio de CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e
- (f) um domínio de CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.
- 25

2. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 1, compreendendo:

- 30 (i) um domínio de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e
- (ii) um domínio de CDR3 de cadeia leve compreendendo a se

quência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

3. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 1, compreendendo um de cada um dos domínios (a), (b) e (c) de CDR de cadeia pesada e/ou um de cada um dos domínios (d), (e) e (f) de CDR de cadeia leve.

4. Proteína de ligação compreendendo:

- (i) um domínio VH o qual compreende um ou mais domínios CDR (a), (b) ou (c) de CDR o ou a de cadeia pesada como definida na reivindicação 1; e/ou
- (ii) um domínio VL o qual compreende um ou mais domínios CDR (d), (e) ou (f) de cadeia leve como definida na reivindicação 1.

5. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que a sequência substancialmente homogênea é uma sequência na qual o referido domínio de CDR contém até 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição de aminoácido.

6. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que a referida sequência substancialmente homóloga é uma sequência na qual o referido domínio de CDR contém até 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição conservativa de aminoácido.

7. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 4 compreendendo:

- (i) um domínio VH o qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma; e/ou
- (ii) um domínio VL o qual compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 ou uma sequência substancialmente homóloga à mesma.

8. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 7, em que a referida sequência substancialmente homóloga é:

- (i) um domínio VH o qual tem pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% de identidade com SEQ ID NO: 9; e/ou

- (ii) um domínio VL o qual tem pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% de identidade com SEQ ID NO: 10.

9. Proteína de ligação compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou um fragmento da mesma ou uma sequência de aminoácido substancialmente homóloga à mesma.

10. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 9, em que a referida sequência substancialmente homóloga compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% de identidade com SEQ ID NO: 2.

11. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína de ligação é um anticorpo ou fragmento de anticorpo ou a proteína de ligação compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

12. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo é um anticorpo inteiro, anticorpo monoclonal, anticorpo policlinal, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

13. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 12, em que o referido anticorpo inteiro é um anticorpo de IgG.

14. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 11, em que o fragmento de anticorpo é um Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, dAbs, dímero TandAbs, anticorpo linear, minicorpo, diacorpo ou multímeros dos mesmos ou um fragmento de anticorpo biespecífico.

15. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 11 a 14, em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende toda ou uma porção de uma região constante de cadeia pesada e/ou toda ou uma porção de uma região constante de cadeia leve kappa ou lambda.

16. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, a qual é tumor-específica.

17. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 16, em que a proteína de ligação se liga a tecido de melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer do ovário, cân-

cer de pâncreas, câncer de pulmão, carcinoma de células escamosas esofageais, câncer de cérebro e/ou câncer de rim.

18. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 e 17, em que a proteína de ligação não se liga significativamente a linfócitos de sangue periférico (PBLs) e/ou não se liga significativamente a granulócitos.

19. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 18, em que a proteína de ligação mostra uma ligação mensurável ou significativa à linhagem de câncer de mama MDA-MB 231, mas mostra ligação insignificante ou não-mensurável a granulócitos ou linfócitos de sangue periférico (PBLs).

20. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, a qual pode se ligar à CD166.

21. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína de ligação tem uma afinidade por um ou mais tipos de células cancerígenas ou pela CD166, em que a referida afinidade de ligação corresponde a uma K_m ou K_d de menos de 500, 400, 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ou 1 nM.

22. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 21, em que a proteína de ligação tem uma afinidade de ligação de $2,9 \times 10^{-8}$ M ou menos ou $2,1 \times 10^{-8}$ M ou menos.

23. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína de ligação tem uma K_m ou K_d por um ou mais tipos de células cancerígenas, a qual é pelo menos 1, de preferência pelo menos 2, 3, 4 ou 5 ordens de magnitude menor do que a K_m para um ou mais tipos de células não-cancerígenas ou normais, quando a afinidade de ligação é ensaiada sob condições comparáveis.

24. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 23, em que a referida célula cancerígena é uma célula de melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer do ovário, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, carci-

noma de células escamosas esofageais, câncer de cérebro e/ou câncer de rim.

25. Proteína de ligação capaz de ligação a um antígeno sobre uma célula tumoral em que a proteína de ligação pode ser identificada através de um método compreendendo:

(1) incubação de um número fixo de células tumorais com uma concentração mínima de uma proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 24, de preferência um anticorpo ou fragmento de anticorpo (Ab1) que gera ligação máxima contra o número fixo de células tumorais e medição da fluorescência média do Ab1 (MF_{Ab1});

(2) testagem de duas ou mais concentrações de uma proteína de ligação de teste (Ab2) através da adição de Ab2 ao Ab1 e células tumorais e medição da fluorescência média ($MF_{(Ab1+Ab2)}$);

(3) medição da fluorescência média de base (MF_{Bgd});

(4) cálculo de PI, em que

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{Bgd})] \times 100; \text{ e}$$

(5) comparação da PI com um valor de PI de controle;

em que uma PI que tem uma diferença estatisticamente significativa com relação à PI de controle indica que a proteína de ligação de teste é capaz de ligação ao antígeno sobre a célula tumoral.

26. Proteína de ligação de acordo com a reivindicação 25, em que a célula tumoral é uma célula de câncer de mama.

27. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína de ligação é uma proteína humana.

28. Proteína de fusão ou conjugado compreendendo uma proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, fundida ou conjugada a um agente terapêutico ou diagnóstico ou uma proteína de ligação à célula, tal como uma imunoglobulina, hormônio, fator de crescimento, lectina, insulina, lipoproteína de baixa densidade, glucagon, endorfina, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína, glutathione-S-transferase (GST), hemaglutinina (HA) ou myc truncada.

29. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, ou uma proteína de fusão ou conjugado de acordo com a reivindicação 28 à qual é preso um ou mais agentes radioterapêuticos, agentes antiangiogênicos, agentes de indução de apoptose, fármacos antitubulina, anticelular, agentes citotóxicos ou coagulantes.

30. Agente diagnóstico ou de formação de imagem compreendendo uma proteína de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 27 ou uma proteína de fusão ou conjugado como definida na reivindicação 28, o qual é rotulado com um marcador detectável.

31. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo a qual codifica uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, ou uma molécula de ácido nucleico substancialmente homóloga à mesma.

32. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 31, compreendendo a sequência de nucleotídeo fornecida em SEQ ID NO: 1 ou uma molécula de ácido nucleico substancialmente homóloga à mesma.

33. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 31 ou a reivindicação 32, em que a referida sequência substancialmente homóloga compreende uma sequência tendo pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% de identidade.

34. Vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações de 31 a 33.

35. Célula hospedeira compreendendo um vetor como definido na reivindicação 34.

36. Célula hospedeira expressando uma ou mais proteínas de ligação, proteínas de fusão ou conjugados como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

37. Animal não-humano transgênico compreendendo uma molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações de 31 a 33 ou um vetor como definido na reivindicação 34.

38. Composição compreendendo uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

ções 1 a 29, ou um agente diagnóstico ou de formação de imagem de acordo com a reivindicação 30 opcionalmente compreendendo, adicionalmente, um ou mais excipientes, veículos, diluentes, tampões ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis.

- 5 39. Kit compreendendo:
 - (i) uma ou mais proteínas de ligação, proteínas de fusão ou conjugados como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29 e/ou
 - (ii) um agente diagnóstico ou de formação de imagem como
 - 10 definido na reivindicação 30 e/ou
 - (iii) uma ou mais moléculas de ácido nucleico como definidos em qualquer uma das reivindicações de 31 a 33 e/ou
 - (iv) um ou mais vetores como definido na reivindicação 34 e/ou
 - (v) uma ou mais células hospedeiras como definidas na reivindicação 35 ou na reivindicação 36 e/ou
 - 15 (vi) uma composição como definida na reivindicação 38.
40. Kit de acordo com a reivindicação 39, para uso em terapia, diagnóstico ou formação de imagem.
41. Kit de acordo com a reivindicação 40, para uso em diagnós-
- 20 tico de câncer.
42. Proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, para uso em terapia, diagnóstico ou formação de imagem.
43. Proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como
- 25 definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, para uso no tratamento de câncer.
44. Agente diagnóstico ou de formação de imagem como definido na reivindicação 30, para uso em diagnóstico.
45. Uso de uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conju-
- 30 gado como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29 na fabricação de um medicamento para uso em terapia, diagnóstico ou formação de imagem de câncer.

46. Uso de um agente diagnóstico ou de formação de imagem como definido na reivindicação 30, na fabricação de uma composição para uso no diagnóstico de câncer.

5 47. Método de tratamento de um indivíduo compreendendo administração de uma quantidade eficaz de uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29, ao indivíduo ou a uma amostra removida do indivíduo e a qual é substancialmente retornada ao indivíduo.

10 48. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o indivíduo é um mamífero, de preferência um ser humano.

49. Método de acordo com a reivindicação 47 ou 48, em que o indivíduo tem câncer.

15 50. Método de diagnóstico de uma doença ou distúrbio em um indivíduo compreendendo a administração de uma quantidade apropriada de uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29, ou um agente diagnóstico ou de formação de imagem como definido na reivindicação 30, ao indivíduo e detecção da presença e/ou quantidade e/ou a localização da proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado no indivíduo.

20 51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que a doença ou distúrbio é câncer.

52. Método de diagnóstico de uma doença em um mamífero compreendendo a etapa de:

25 (1) contato de uma amostra de teste tomada do referido mamífero com qualquer um ou mais das proteínas de ligação, proteínas de fusão ou conjugados como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 29.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, o qual compreende, adicionalmente, as etapas de:

30 (2) medição da presença e/ou quantidade e/ou localização de um complexo formado entre as proteínas de ligação, proteínas de fusão ou conjugados e um antígeno na amostra de teste; e, opcionalmente

(3) comparação da presença e/ou quantidade de ligação da proteína de fusão, proteína de ligação ou complexo de conjugado-antígeno na amostra de teste com um controle.

54. Método de formação de imagem de um indivíduo compreendendo administração de uma quantidade apropriada de uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, ou um agente diagnóstico ou de formação de imagem como definido na reivindicação 30, ao indivíduo e detecção da presença e/ou quantidade e/ou localização da proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado ou agente diagnóstico ou de formação de imagem no indivíduo.

55. Kit de acordo com a reivindicação 41, proteína de acordo com a reivindicação 43, uso de acordo com a reivindicação 45 ou 46 ou método de acordo com a reivindicação 49, 51, 52 ou 54 em que a referida doença é melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, carcinoma de células escamosas esofageais, câncer de cérebro e/ou câncer de rim.

56. Método de produção de uma proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, compreendendo uma etapa de cultura das células hospedeiras como definidas na reivindicação 35 ou 36.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, o qual compreende, adicionalmente, a etapa de isolamento ou purificação da proteína de ligação, proteína de fusão ou conjugado e/ou formulação do produto em uma composição incluindo pelo menos um componente adicional, tal como um veículo, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

58. Método de ligação à CD166 compreendendo contato de uma composição contendo CD166 com uma proteína de ligação como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 27 ou um conjugado da mesma.

59. Método de detecção de CD166 compreendendo contato de uma composição suspeita de conter tal molécula de CD166 com uma proteí-

na de ligação como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 27, ou um conjugado da mesma sob condições eficazes para permitir a formação de complexos de CD166/proteína de ligação e detecção dos complexos assim formados.

5 60. Composição de acordo com a reivindicação 38, em que a referida composição ainda compreende um agente ativo adicional.

61. Composição de acordo com a reivindicação 60, em que o referido agente ativo adicional é um agente pró-apoptótico.

10 62. Composição de acordo com a reivindicação 60 em que o referido agente ativo adicional é um ou mais selecionado do grupo consistindo em anticorpos os quais se ligam a outros alvos, citocinas, antimetabólitos, agentes de alquilação, análogos de purina e inibidores relacionados, análogos de pirimidina, análogos de ácido fólico, vinca alcaloides, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginase, estrogênios, antiestrogênios, androgênios, 15 anti-androgênios, adrenocorticosteroides, progestinas, supressor adrenocortical, análogos de hormônio de liberação de gonadotropina, interferons, inibidor de topoisomerase, ureia antracenodiona-substituída, derivados de metil hidrazina, complexos de coordenação de platina ou agentes químicos e fármacos de controle de efeitos colaterais.

20 63. Proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, ou um conjugado da mesma para uso em combinação com um agente pró-apoptótico em terapia.

25 64. Produto contendo a proteína de ligação como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, ou um conjugado da mesma junto com um agente pró-apoptótico como um preparado combinado para uso separado, sequencial ou simultâneo em terapia.

65. Proteína de ligação, produto ou composição como definidos em qualquer uma das reivindicações 61, 63 ou 64, em que o referido agente pró-apoptótico é estaurosporina.

Seqüência de nucleotídeo

CCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGA
 NcoI |——— Início de V_H (SEQ ID No 1 Início)
 GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGTACATACTACGCAG
 ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGGGGGGAGGAGTGGTCTGA
 ATTTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAA
 Final de V_H ———| HindIII |——— Início de ligante
 AACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTTCC
 Final de ligante ———| MluI ———|——— Início de V_L
 TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGACATTAGCAGTTAT
 TTCGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTT
 CGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
 AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGGAT
 CACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAGCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATC
 Final de V_L (SEQ ID No 1 Final) ———| NotI
TCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAA

seqüência de aminoácido

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS
 |——— início de V_H (SEQ ID No 2 Início)
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGVVEFWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEEG
 final de V_H ———| — ligante —
 EFSEARVDIRMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQDISSYFAWYQQKPKAPKLLIYAASLRSRVPSRF
 ligante ———|——— Início de V_L
 SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPRITFGQGTREIK
 Final de V_L (SEQ ID No 2 Final) ———|

FIG. 1

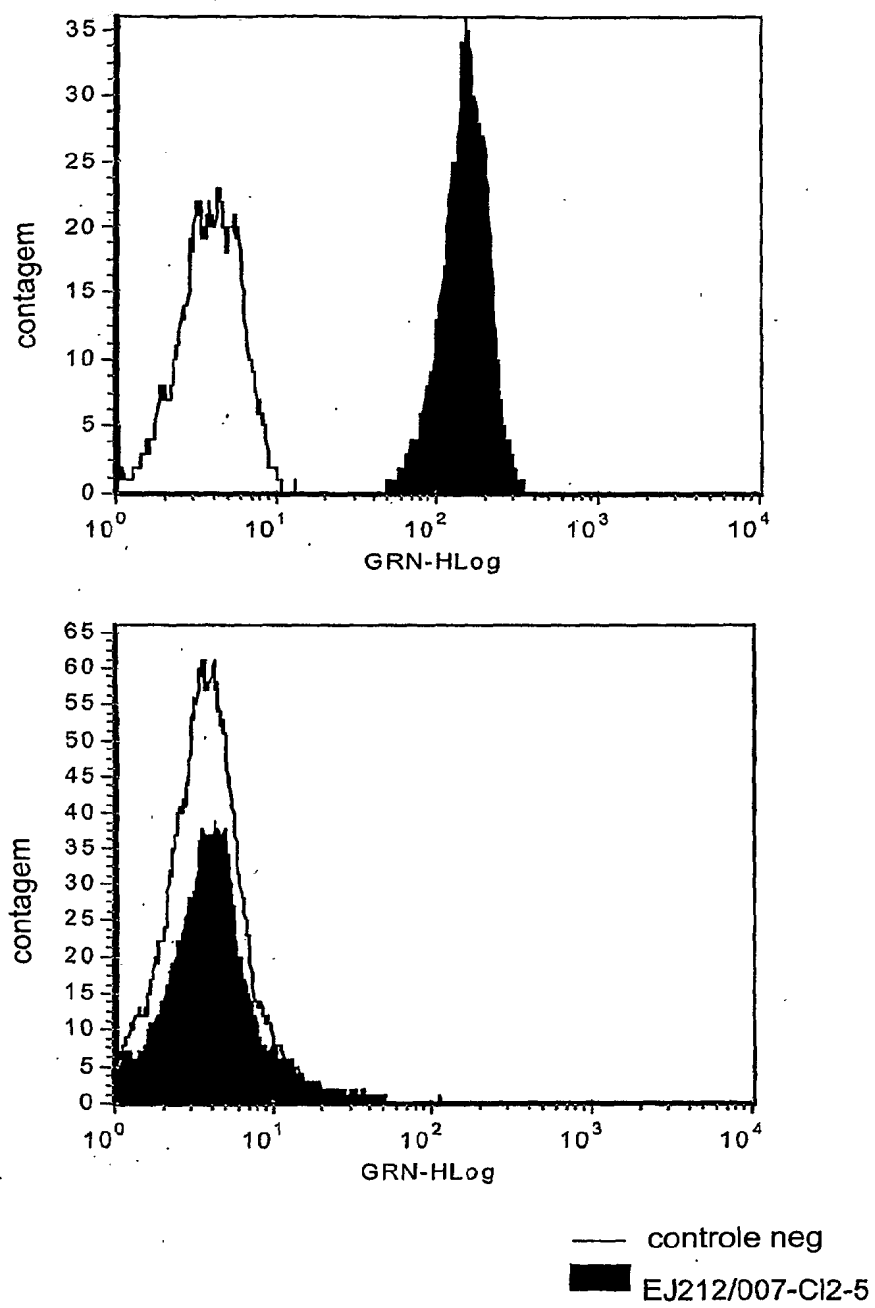


FIG. 2a e FIG. 2b

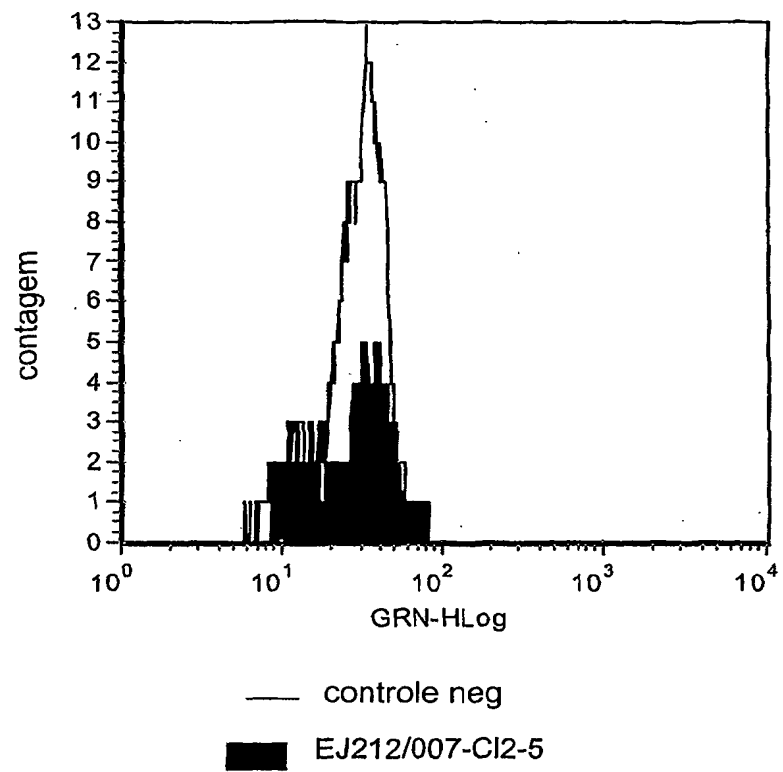


FIG. 2c

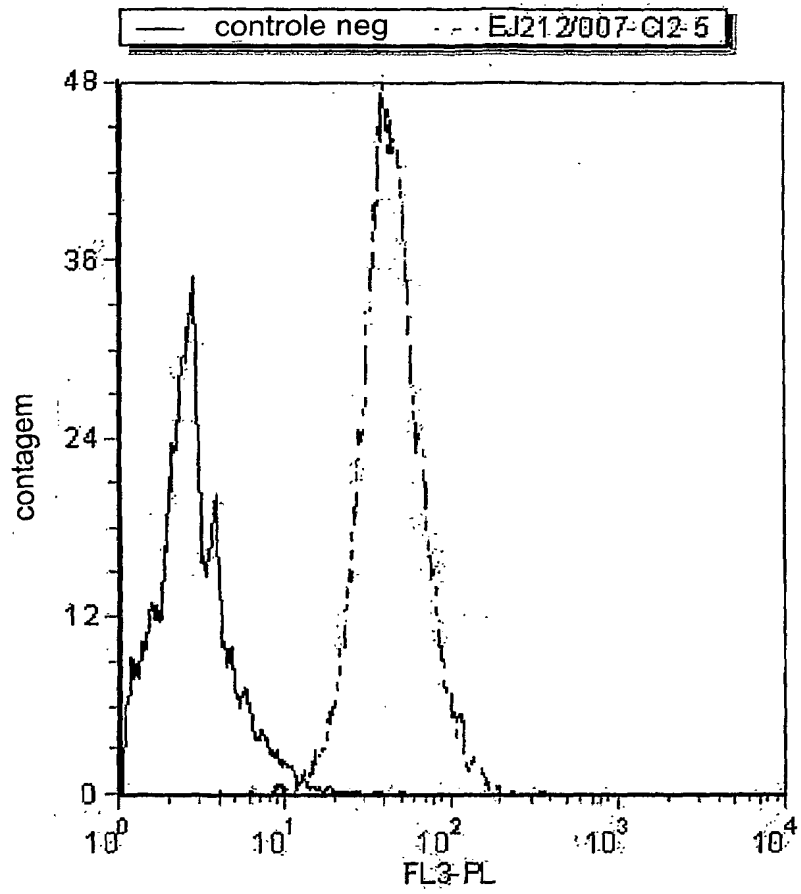


FIG. 2d

FIG. 3A

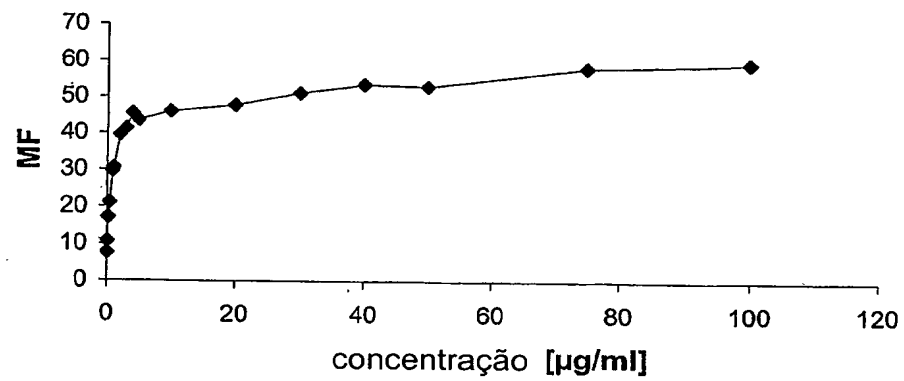
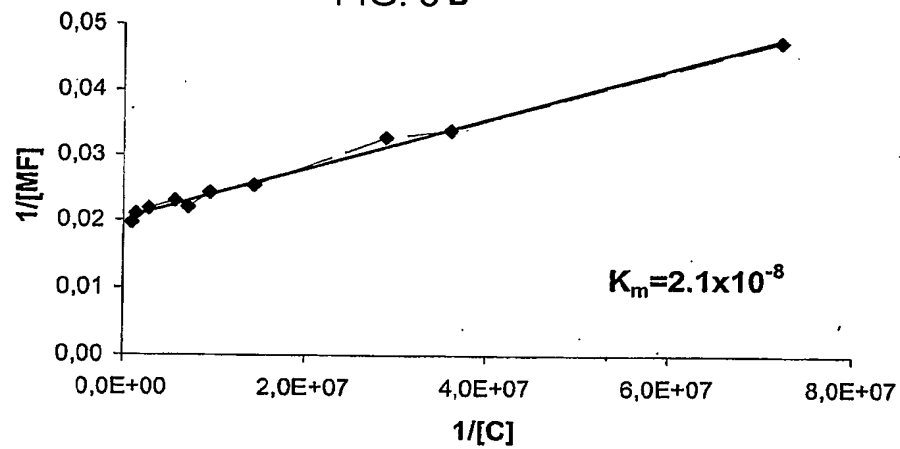


FIG. 3 B



MF = fluorescência média
C = concentração molar

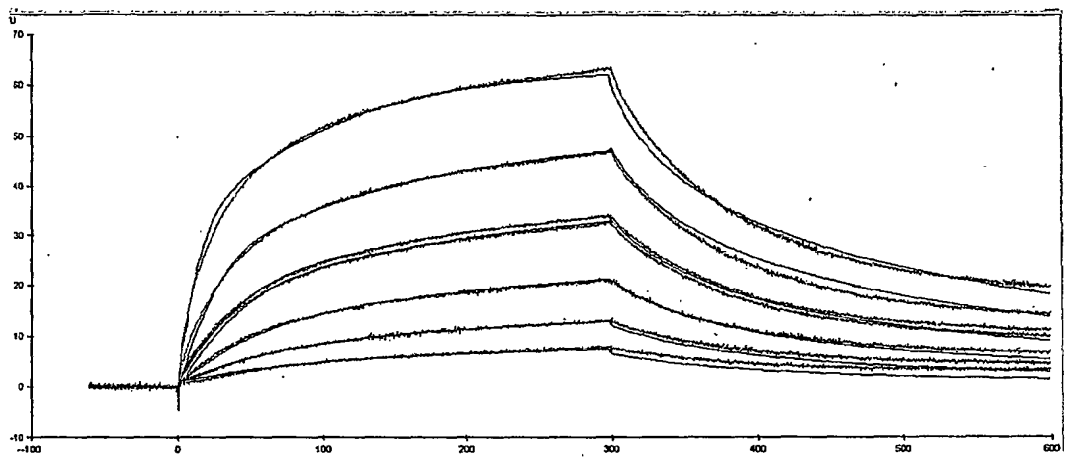


FIG. 3c

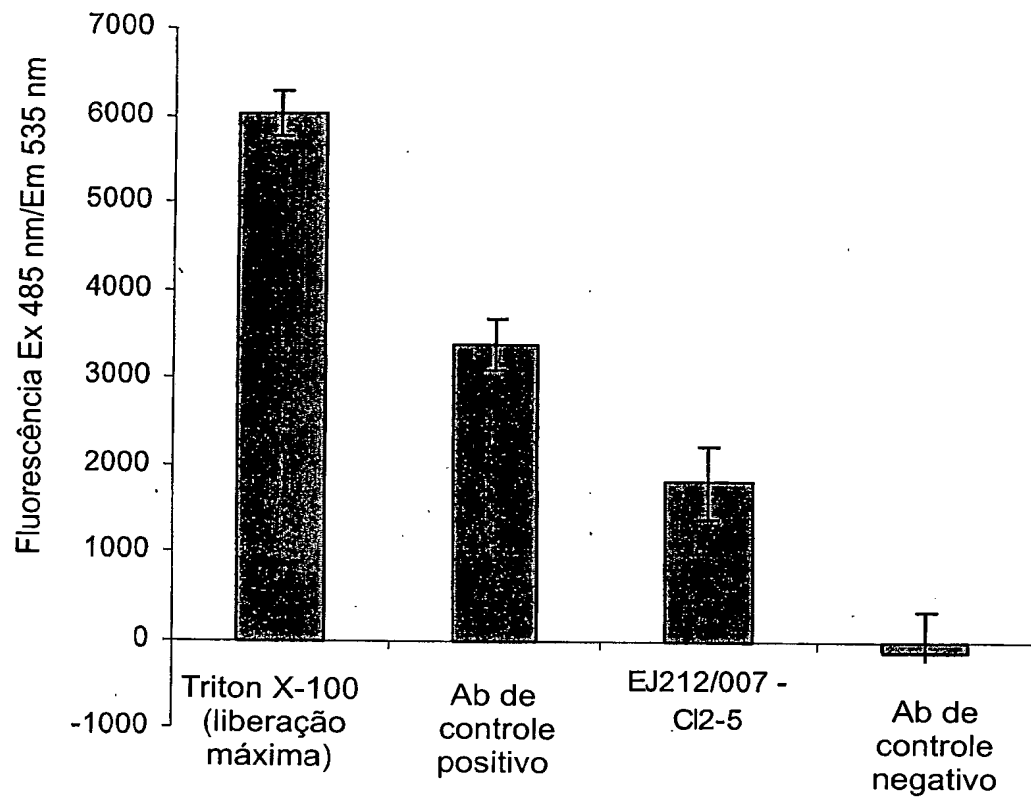


FIG. 4

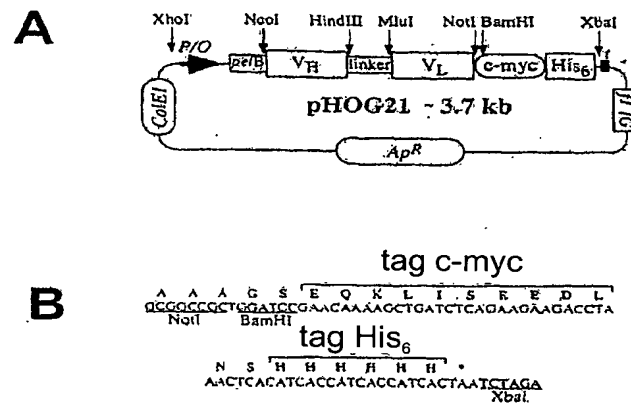


FIG. 5

9/18

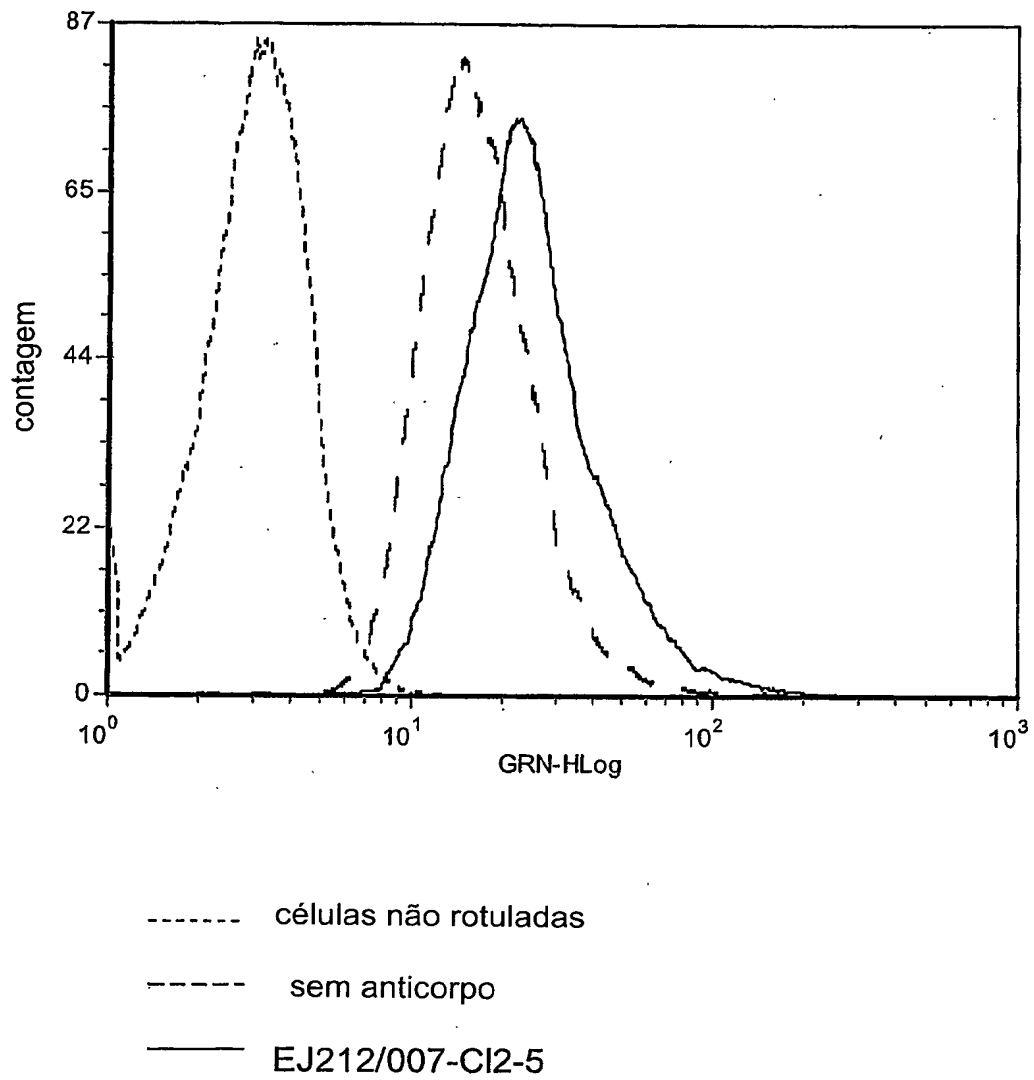


FIG. 6

10/18

FIG. 7A

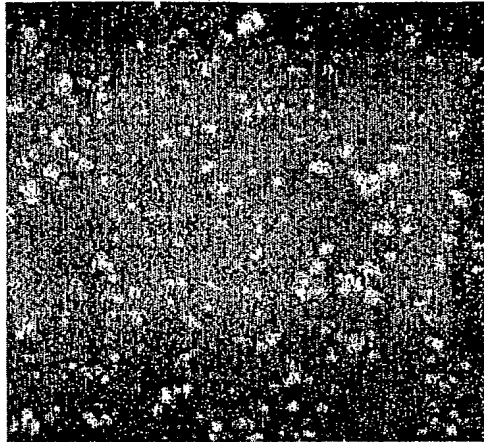
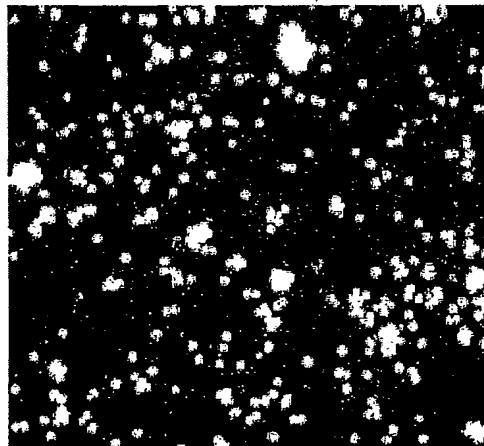


FIG. 7 B



11/18

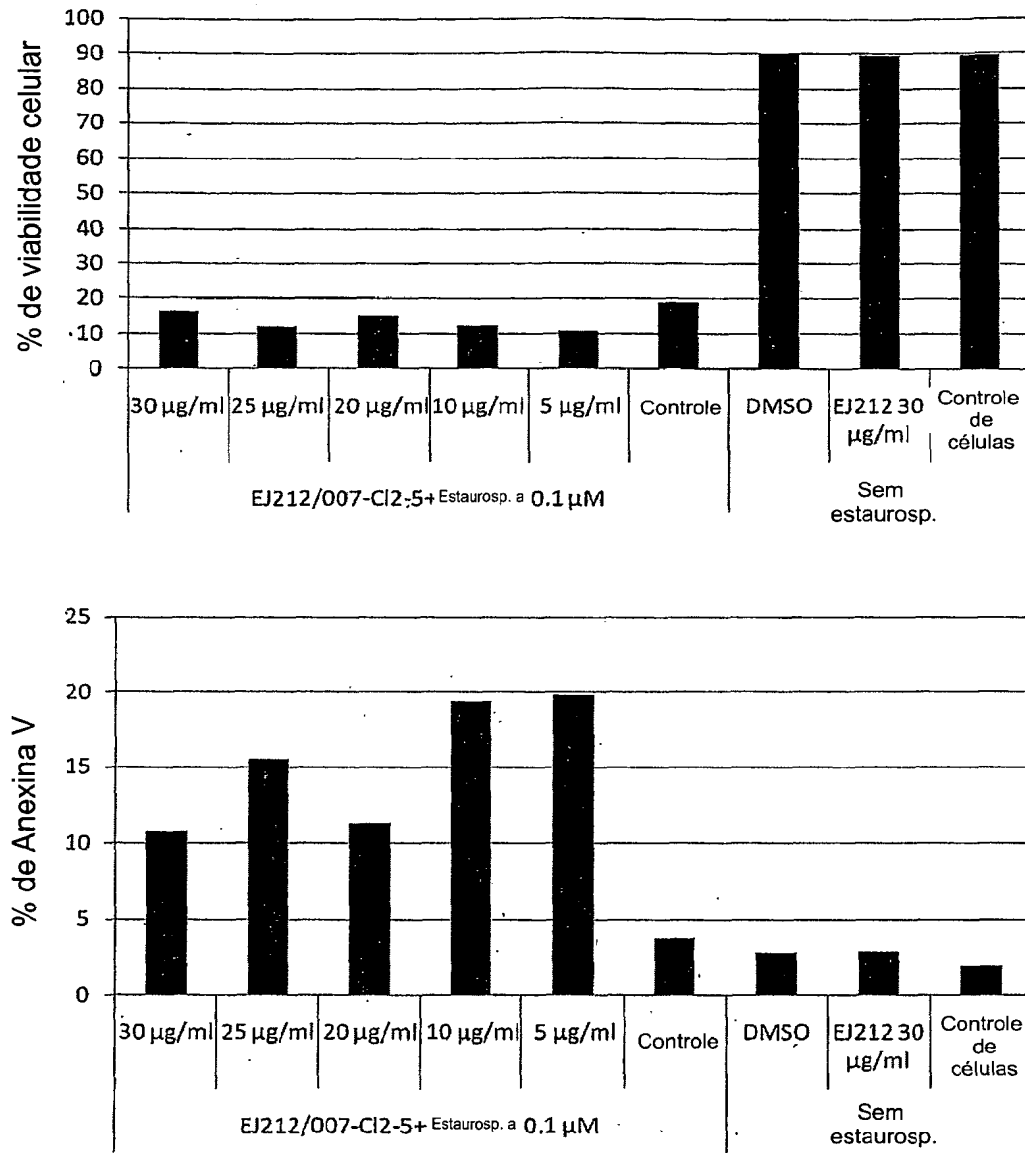


FIG. 8

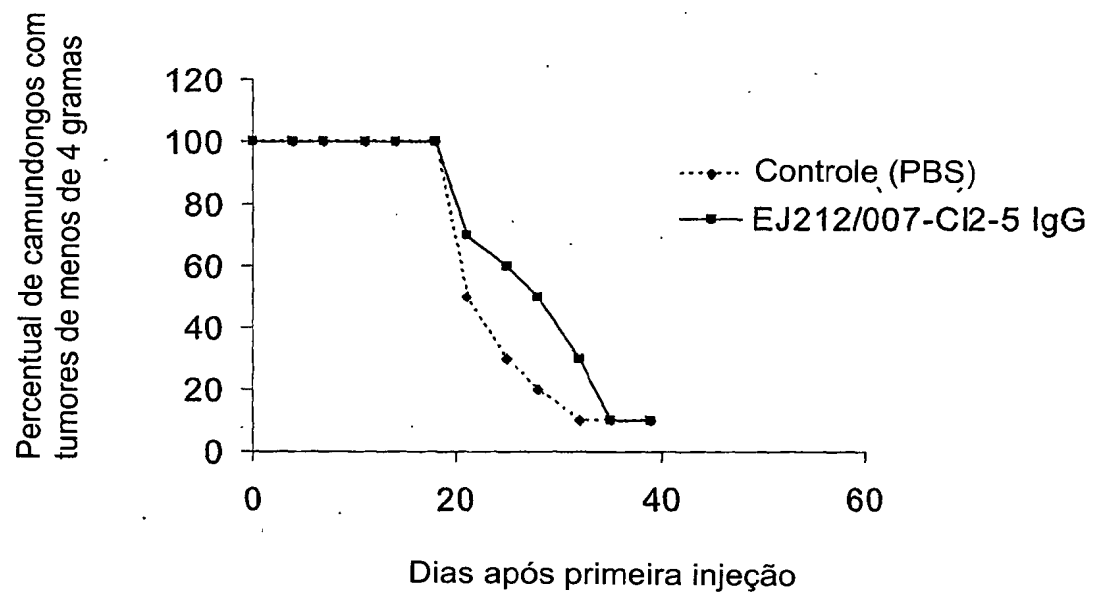
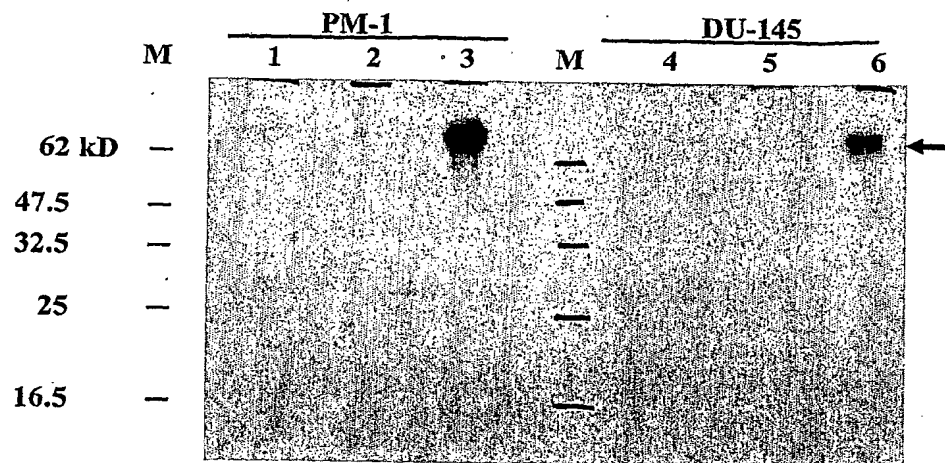
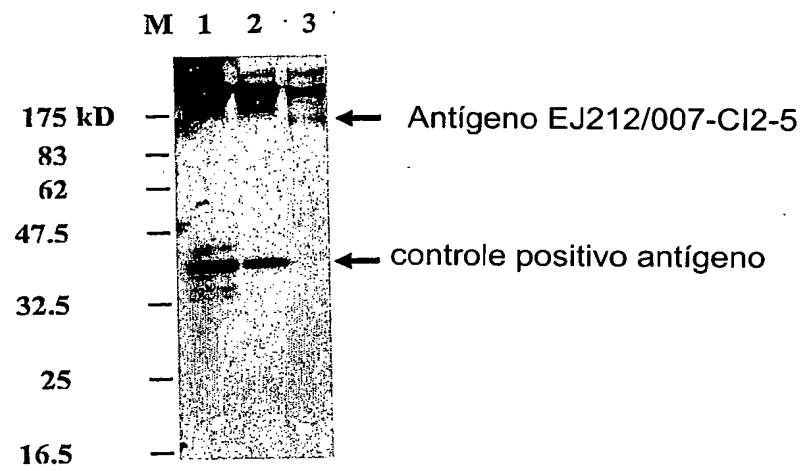


FIG. 9



1. Fração citosólica de PM-1
 2. Fração de membrana de PM-1
 3. Fração de membrana concentrada de PM-1
 4. Fração citosólica de DU-145
 5. Fração de membrana de DU-145
 6. Fração de membrana concentrada de DU-145
- M = marcador com pesos moleculares em kD

FIG. 10



M = marcador com pesos moleculares em kD
1. PM-1 + IgG de controle positivo
2. DU-145 + IgG de controle positivo
3. PM-1 + EJ212/007-C12-5 IgG

FIG. 11

FIG. 12

Informação de proteína

Nome da proteína:	Proteína MEMD [Homo sapiens]
Número AlphaLysé	ALPHA05808
Número GI	gi 3183975
MW:	64930
pI:	5,92
Escore de Mascot	229
Cobertura de sequência	23%

Informação de Análise

- Digestão em gel, clivagem através de tripsina: corta o lado C-term de KR, a menos que o próximo resíduo seja P
- Método de análise de MS: Caracterização de perfil de massa de peptídeo por MALDI-TOF e sequenciamento de peptídeo por MALDI-
- Modificações variáveis: Carbamidometila (C). Oxidação (M)
- Programa de busca em banco de dados: Mascot versão 1.9.03
- Permitido até 1 clivagem errônea
- Banco de Dados: NRDB (3946334 seqüências de proteína)

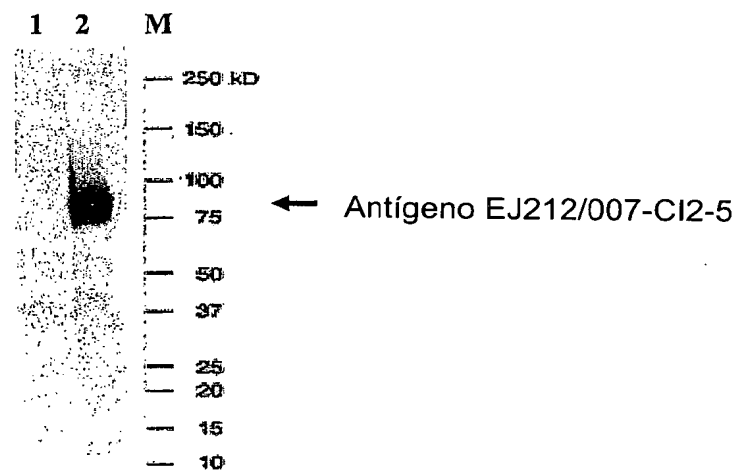
Seqüência de proteína

Peptídeos equivalentes mostrados em sublinhado em negrito

1 ESKGRASSCL LPCLLISATV FRPGLGWYIV NSAYGDTIII PCRLDVPQNL
 51 MEGKWKYERP DGSPVPIAFR SSTKKSVQED DVPEYEDRLN LSNTYILSIS
 101 NARISDEKRF VCNLVIEDNV FEAPTIVKVT KQPSKPEIVS KALELETEQL
 151 KKLGGCISED SYDGNITWY RNGKVLHPLE SAVVIIPKKE MDPVTQLYTM
 201 TSSEMYKTKK ADIQMPFTCS VITYYGPSSGQK TIHSEQAVFD IYYPTQVTI
 251 QVLFPKNAIK EGDNITLKCL GNGNPPPEEF LFYLPQPEG IRSENYYTLE
 301 DVRUNRTG DY KCSLIDKKSM IASTAIVVHY LDLSLNPESGE VIRQIGDALP
 351 VSCGISASRN ATVVMKDN RLRSSEPSFS LHYQDAGNYV CETALQEVES
 401 LKGRSITLLI VEGKQIKNT RKTOPSGLSK TIICHVEGFP KPAIQWITG
 451 EGSVINQTEE SPYINGRYYS KIIISPEENV TLTCAENQL ERTVNSLNV
 501 AISIPENDEK DEISDENREK VNDQAKLIVG IVVGLLLAAL VAGVVIWLYM
 551 KKSKTASKEV KRDLGNNMEN KKLEENNPKT EA

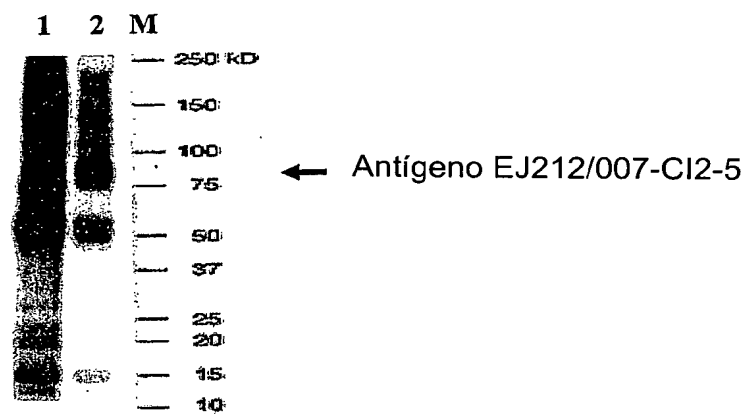
Peptídeos usados para identificação

Início - Fim	Observado	Mr (esperado)	Mr (calc.)	Delta	Faltando	Seqüência
57 - 70	1625, 80	1624, 80	1624, 82	-0,03	0	YKPDGSPVPIAFR
76 - 88	1613, 71	1612, 70	1612, 74	-0,03	1	SYQYEDVPEYKDR
129 - 141	1486, 82	1485, 81	1485, 86	-0,04	1	VFKQSRSHREIVSK (Ions score 1)
142 - 151	1191, 63	1190, 62	1190, 65	-0,04	0	ALFLETEQLK
142 - 152	1319, 72	1318, 72	1318, 75	-0,03	1	ALFLETEQLKK (Ions score 40)
190 - 207	2181, 98	2180, 97	2180, 99	-0,01	0	EMDPVTQLYIMISILEYK 2 Oxidat
208 - 230	2596, 28	2595, 27	2595, 20	0,07	1	TKRADIQMPFTCSVITYYGPSSGQK Car
211 - 230	2266, 01	2265, 01	2265, 01	0,00	0	(C); Oxidation (M)
293 - 304	1412, 69	1411, 68	1411, 71	-0,02	1	ADIQMPFTCSVITYYGPSSGQK Carban
344 - 359	1674, 82	1673, 81	1673, 84	-0,03	(C); Oxidation (M)	SENYYTLIDVRR
405 - 418	1554, 85	1553, 84	1553, 90	-0,06	0	QIGDALPVSCITISASR Carbamidon
					(Ions score 42)	ESLTLIVEGKPKIK (Ions score



1. scFv de controle
 2. scFv EJ212/007-C12-5
 M = marcador com pesos moleculares em kD

FIG. 13



1. scFv de controle
 2. scFv EJ212/007-CI2-5
 M = marcador com pesos moleculares em kD

FIG. 14

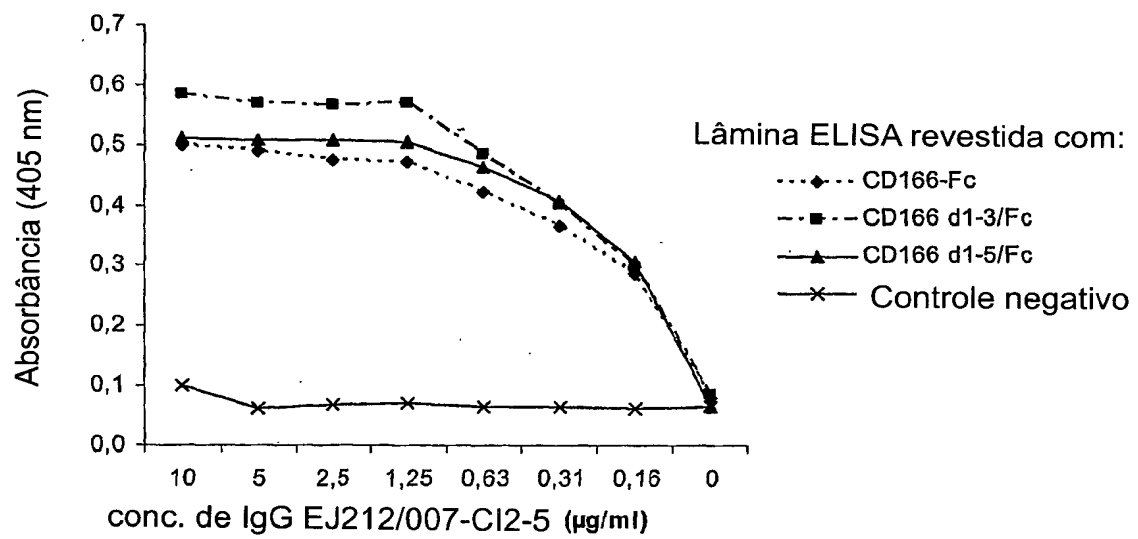


FIG. 15

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPO DE ANTI CD166 HUMANO LIGANDO CÉLULAS TUMORAIS HUMANO"**.

5 A presente invenção refere-se à proteínas de ligação tumor-específicas e todos os usos das mesmas. Em particular, a invenção refere-se a anticorpos ou fragmentos de anticorpo específicos para antígenos ou moléculas sobre células cancerígenas (CD166) e a métodos de uso dos mesmos. Proteínas de ligação compreendendo CDRs de cadeias pesada e leve específicas são descritas, em que a proteína de ligação mostra uma
10 ligação mensurável ou significativa à linhagem de célula de câncer de mama MDA-MB 231, mas mostra ligação insignificante ou não-mensurável a granulócitos ou linfócitos de sangue periférico (PBLs).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Affitech S/A
 <120> ANTICORPO DE ANTI CD166 HUMANO LIGANDO CÉLULAS TUMORAIS HUMANO
 <130> 69.68.91493/02
 <150> GB0705775.5
 <151> 26/03/2007
 <160> 13
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> fragmento de anticorpo com cadeia variável única
 <400> 1
 gaggtgcagc tgttggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt cgcagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaggggggga 300
 ggagtggctg aattttgggg ccagggaacc ctgggtcactg tctcctcaaa gctttcaggg 360
 agtgcacccg ccccaaaact tgaagaaggt gaattttcag aagcacgcgt agacatccgg 420
 atgacccagt ctccatcctt cctgtctgca tctgtaggag acagagtcac catcacttgc 480
 cggggccagtc aggacattag cagttatttc gcctgggtatc agcaaaaacc agggaaagcc 540
 cctaagctcc tgatctatgc tgcattcact ttgcgaagtg ggggtccatc aagggtcagc 600
 ggagtggtat ctggggacaga ttctactctc accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt 660
 gcaacttact actgtcaaca gagttacagt acccctcgga tcaccttcgg ccaagggaca 720
 cgactggaga ttaaa 735

 <210> 2
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> fragmento de anticorpo com cadeia variável única
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu
115 120 125

Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Arg
180 185 190

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys
245

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> região 1 de determinação de complementaridade de cadeia pesada

<400> 3

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> região 2 de determinação de complementaridade de cadeia pesada

<400> 4

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

Gly

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região 3 de determinação de complementaridade de cadeia pesada
 <400> 5
 Gly Gly Gly Val Val Glu Phe
 1

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região 1 de determinação de complementaridade de cadeia leve
 <400> 6
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Phe Ala
 1

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região 2 de determinação de complementaridade de cadeia leve
 <400> 7
 Ala Ala Ser Thr Leu Arg Ser
 1

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região 3 de determinação de complementaridade de cadeia leve
 <400> 8
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Ile Thr
 1

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> cadeia pesada de anticorpo
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> cadeia leve de anticorpo

<400> 10

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 14
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> cadeia pesada variável
 <400> 14

gaggtgcagc tgttggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaggggggga 300
 ggagtggtcg aattttgggg ccagggaacc ctggtcactg tctcctca 348

<210> 15
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>

<223> cadeia leve variável
 <400> 15
 gacatccgga tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gacattagc agttatttcg cctggatatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcattcactt tgcgaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcggat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 1 de cadeia pesada
 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 2 de cadeia pesada
 <400> 17
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 3 de cadeia pesada
 <400> 18
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 4 de cadeia pesada
 <400> 19
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>

<223> região de estrutura 1 de cadeia leve
 <400> 20
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 2 de cadeia leve
 <400> 21
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 3 de cadeia leve
 <400> 22
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> região de estrutura 4 de cadeia leve
 <400> 23
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> peptídeo
 <220>
 <221> SÍTIO
 <222> (1)..(2)
 <223> sítio de clivagem de tripsina
 <220>
 <221> SÍTIO
 <222> (15)..(16)
 <223> sítio de clivagem de tripsina
 <400> 24
 Lys Val Leu His Pro Leu Glu Gly Ala Val Val Ile Ile Phe Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> peptídeo

```

<220>
<221> SÍTIO
<222> (1)..(2)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> oxidado
<220>
<221> SÍTIO
<222> (26)..(27)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<400> 25
Lys Ser Met Ile Ala Ser Thr Ala Ile Thr Val His Tyr Leu Asp Leu
1          5          10          15

Ser Leu Asn Pro Ser Gly Glu Val Thr Arg Gln
          20          25

<210> 26
<211> 26
<212> PRT
<213> sequência artificial
<220>
<223> peptídeo
<220>
<221> SÍTIO
<222> (1)..(2)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<220>
<221> SÍTIO
<222> (25)..(26)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<400> 26
Lys Cys Leu Gly Asn Gly Asn Pro Pro Pro Glu Glu Phe Leu Phe Tyr
1          5          10          15

Leu Pro Gly Gln Pro Glu Gly Ile Arg Ser
          20          25

<210> 27
<211> 28
<212> PRT
<213> sequência artificial
<220>
<223> peptídeo
<220>
<221> SÍTIO
<222> (1)..(2)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<220>
<221> SÍTIO
<222> (27)..(28)
<223> sítio de clivagem de tripsina
<400> 27
Lys Thr Ile His Ser Glu Gln Ala Val Phe Asp Ile Tyr Tyr Pro Thr
1          5          10          15

Glu Gln Val Thr Ile Gln Val Leu Pro Pro Lys Asn
          20          25

<210> 28
<211> 582
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28
Glu Ser Lys Gly Ala Ser Ser Cys Arg Leu Leu Phe Cys Leu Leu Ile

```

1	5	10	15
Ser	Ala	Thr	Val
20	Phe	Arg	Pro
Gly	Leu	Gly	Trp
25	Tyr	Thr	Val
30	Asn	Ser	
Ala	Tyr	Gly	Asp
35	Thr	Ile	Ile
40	Pro	Cys	Arg
45	Leu	Asp	Val
Pro	Gln		
Asn	Leu	Met	Phe
50	Gly	Lys	Trp
55	Lys	Tyr	Glu
60	Lys	Pro	Asp
Gly	Ser	Pro	
Val	Phe	Ile	Ala
65	Phe	Arg	Ser
70	Ser	Ser	Thr
75	Lys	Lys	Ser
80	Val	Gln	Tyr
Asp	Val	Pro	Glu
85	Tyr	Lys	Asp
90	Arg	Leu	Asn
95	Leu	Ser	Glu
Asn	Tyr	Thr	
Leu	Ser	Ile	Ser
100	Asn	Ala	Arg
105	Ile	Ser	Asp
110	Glu	Lys	Arg
Phe	Val	Cys	
Met	Leu	Val	Thr
115	Glu	Asp	Asn
120	Val	Phe	Glu
125	Ala	Pro	Thr
Ile	Val	Lys	
Val	Phe	Lys	Gln
130	Pro	Ser	Lys
135	Pro	Glu	Ile
140	Val	Ser	Lys
Ala	Leu	Phe	
Leu	Glu	Thr	Glu
145	Gln	Leu	Lys
150	Lys	Leu	Gly
155	Asp	Cys	Ile
160	Ser	Glu	Asp
Ser	Tyr	Pro	Asp
165	Gly	Asn	Ile
170	Thr	Trp	Tyr
175	Arg	Asn	Gly
Lys	Val	Leu	
His	Pro	Leu	Glu
180	Gly	Ala	Val
185	Val	Ile	Ile
190	Phe	Lys	Lys
Glu	Met	Asp	
Pro	Val	Thr	Gln
195	Leu	Tyr	Thr
200	Met	Thr	Ser
205	Thr	Leu	Glu
Tyr	Lys	Thr	
Thr	Lys	Ala	Asp
210	Ile	Gln	Met
215	Pro	Phe	Thr
220	Cys	Ser	Val
Thr	Tyr	Tyr	
Gly	Pro	Ser	Gly
225	Gln	Lys	Thr
230	Ile	His	Ser
235	Glu	Gln	Ala
240	Val	Phe	Asp
Ile	Tyr	Tyr	Pro
245	Thr	Glu	Gln
250	Val	Thr	Ile
255	Gln	Val	Leu
Pro	Pro	Lys	
Asn	Ala	Ile	Lys
260	Glu	Gly	Asp
265	Asn	Ile	Thr
270	Leu	Lys	Cys
Leu	Gly	Asn	

Gly Asn Pro Pro Pro Glu Glu Phe Leu Phe Tyr Leu Pro Gly Gln Pro
 275 280 285

Glu Gly Ile Arg Ser Ser Asn Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Val Arg Arg
 290 295 300

Asn Ala Thr Gly Asp Tyr Lys Cys Ser Leu Ile Asp Lys Lys Ser Met
 305 310 315 320

Ile Ala Ser Thr Ala Ile Thr Val His Tyr Leu Asp Leu Ser Leu Asn
 325 330 335

Pro Ser Gly Glu Val Thr Arg Gln Ile Gly Asp Ala Leu Pro Val Ser
 340 345 350

Cys Thr Ile Ser Ala Ser Arg Asn Ala Thr Val Val Trp Met Lys Asp
 355 360 365

Asn Ile Arg Leu Arg Ser Ser Pro Ser Phe Ser Ser Leu His Tyr Gln
 370 375 380

Asp Ala Gly Asn Tyr Val Cys Glu Thr Ala Leu Gln Glu Val Glu Gly
 385 390 395 400

Leu Lys Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Ile Val Glu Gly Lys Pro Gln
 405 410 415

Ile Lys Met Thr Lys Lys Thr Asp Pro Ser Gly Leu Ser Lys Thr Ile
 420 425 430

Ile Cys His Val Glu Gly Phe Pro Lys Pro Ala Ile Gln Trp Thr Ile
 435 440 445

Thr Gly Ser Gly Ser Val Ile Asn Gln Thr Glu Glu Ser Pro Tyr Ile
 450 455 460

Asn Gly Arg Tyr Tyr Ser Lys Ile Ile Ile Ser Pro Glu Glu Asn Val
 465 470 475 480

Thr Leu Thr Cys Thr Ala Glu Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser
 485 490 495

Leu Asn Val Ser Ala Ile Ser Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu
 500 505 510

Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile
 515 520 525

Val Gly Ile Val Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val
 530 535 540

Val Tyr Trp Leu Tyr Met Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ser Lys His Val
 545 550 555 560

Asn Lys Asp Leu Gly Asn Met Glu Glu Asn Lys Lys Leu Glu Glu Asn
 565 570 575

Asn His Lys Thr Glu Ala
 580

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Tyr Glu Lys Pro Asp Gly Ser Pro Val Phe Ile Ala Phe Arg
 1 5 10

<210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Ser Val Gln Tyr Asp Asp Val Pro Glu Tyr Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Val Phe Lys Gln Pro Ser Lys Pro Glu Ile Val Ser Lys
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Ala Leu Phe Leu Glu Thr Glu Gln Leu Lys
 1 5 10

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Ala Leu Phe Leu Glu Thr Glu Gln Leu Lys Lys
 1 5 10

<210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Glu Met Asp Pro Val Thr Gln Leu Tyr Thr Met Thr Ser Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Tyr Lys

<210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35

Thr Thr Lys Ala Asp Ile Gln Met Pro Phe Thr Cys Ser Val Thr Tyr
 1 5 10 15

Tyr Gly Pro Ser Gly Gln Lys
 20

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Ser Asn Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Val Arg Arg
 1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Ile Gly Asp Ala Leu Pro Val Ser Cys Thr Ile Ser Ala Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Glu Ser Leu Thr Leu Ile Val Glu Gly Lys Pro Gln Ile Lys
 1 5 10