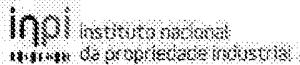

(11) Número de Publicação: **PT 2502938 E**



(51) Classificação Internacional:

C07K 16/30 (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)
A61P 35/00 (2015.01) **C12N 15/13** (2015.01)
C12N 5/10 (2015.01) **A61K 47/48** (2015.01)
A61K 51/10 (2015.01) **A61K 49/00** (2015.01)
A61K 39/00 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.10.26**

(30) Prioridade(s): **2006.10.27 US 863295 P**
2006.12.05 US 868707 P
2007.03.30 US 921300 P
2007.06.29 US 937857 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.09.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.02.18**
109/2015

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.
1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990 **US**

(72) Inventor(es):

AYA JAKOBOVITS **US**
PAUL POLAKIS **US**
MARK S. DENNIS **US**
BONNEE RUBINFELD **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS E IMUNOCONJUGADOS E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS ANTICORPOS ANTI-STEAP-1 E SEUS IMUNOCONJUGADOS. SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-STEAP-1 E SEUS IMUNOCONJUGADOS.

RESUMO

"Anticorpos e imunoconjugados e suas utilizações"

São proporcionados anticorpos anti-STEAP-1 e seus imunoconjugados. São proporcionados métodos de utilização de anticorpos anti-STEAP-1 e seus imunoconjugados.

DESCRIÇÃO

"Anticorpos e imunoconjugados e suas utilizações"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-STEAP-1 e seus imunoconjugados. A invenção refere-se adicionalmente a métodos de utilização de anticorpos anti-STEAP-1 e de seus imunoconjugados.

ANTERIORIDADE

Em seres humanos, o cancro da próstata é uma das mais comuns malignidades diagnosticadas no sexo masculino e é a segunda principal causa de mortes relacionadas com cancro nos homens. A American Cancer Society estima que no ano 2000, serão diagnosticados 180 400 novos casos de cancro da próstata com 31 900 mortes provocadas pela doença. Em estágios avançados, o cancro da próstata metastiza para o osso. Embora tenham sido alcançados avanços no diagnóstico precoce e no tratamento de tumores localmente confinados, o cancro da próstata é incurável uma vez que tenha metastizado. Pacientes com cancro da próstata metastático sob terapia hormonal desenvolverão eventualmente um estado refractário a androgénios (independente de androgénios) que conduzirá à progressão da doença e à morte. Actualmente, o antígeno específico da próstata (PSA) é o marcador tumoral mais amplamente utilizado para o rastreio, diagnóstico e monitorização do cancro da próstata. Contudo, a utilização disseminada do PSA como ferramenta para o rastreio é controversa pois o PSA não consegue discriminar com precisão entre doença da próstata benigna e maligna.

Dependendo do estágio do cancro, o tratamento do cancro da próstata e da bexiga envolve uma, ou uma combinação, das seguintes terapias: cirurgia para remover o tecido canceroso, terapia com radiação, quimioterapia, privação de androgénios (e.g., terapia hormonal) no caso de cancro da próstata. Embora a terapia cirúrgica ou com radiação melhore significativamente a sobrevivência em pacientes com estágios precoces da doença, as opções terapêuticas são muito limitadas para casos avançados, particularmente para recorrências do tumor após ablação hormonal. A maioria dos pacientes que são submetidos a terapia hormonal progridem para o desenvolvimento de doença

independente de androgénios. Actualmente, não existe nenhum tratamento eficaz para os 20-40% dos pacientes de cancro da próstata que desenvolvem doença recorrente após cirurgia ou terapia com radiação, ou para aqueles em quem o cancro tenha metastizado no momento do diagnóstico. A quimioterapia tem os seus efeitos secundários tóxicos, especialmente em pacientes mais idosos. O desenvolvimento de novas formas de terapia especialmente para doença refractária à privação de androgénios constitui uma necessidade urgente na gestão do carcinoma prostático.

A identificação de um novo antigénio da superfície celular, STEAP-1, foi descrita (veja-se a Patente N.º US 6,329,503). O STEAP-1 é membro dos antigénios transmembranares da serpentina da superfície celular. É expresso predominantemente no cancro da próstata, e assim, os membros desta família foram denominados "STEAP" (do inglês "*Six Transmembrane Epithelial Antigens of the Prostate*" - Antigénios epiteliais da próstata de seis domínios transmembranares). As proteínas STEAP humanas exibem um elevado grau de conservação estrutural dentro da família mas não apresentam homologia estrutural significativa com nenhuma proteína humana conhecida. A STEAP-1 parece ser uma proteína de membrana do tipo IIIa expressa predominantemente em células da próstata em tecidos humanos normais. Estruturalmente, a STEAP-1 é uma proteína de 339 aminoácidos caracterizada por uma topologia molecular de seis domínios transmembranares e terminais N e C intracelulares, sugerindo que se dobra numa "serpentina" em três voltas extracelulares e duas intracelulares. A expressão da proteína STEAP-1 é mantida em níveis elevados ao longo de vários estados do cancro da próstata. A STEAP-1 é altamente sobre-expressa em outros cancros humanos tais como do pulmão e do cólon. Foram criados anticorpos murinos contra fragmentos de STEAP-1 humana e mostrou-se que os anticorpos se ligam a STEAP-1 na superfície da célula (veja-se o Pedido de Patente US com Publicação N.º 20040253232A1). WO 2005/113601 A divulga anticorpos monoclonais anti-STEAP-1. WO 2006/034488A divulga anticorpos manipulados com cisteína.

A terapia à base de anticorpos provou-se muito eficaz no tratamento de vários cancros. Por exemplo, o HERCEPTIN® e o RITUXAN® (ambos da Genentech, S. San Francisco) foram utilizados com sucesso para tratar o cancro da mama e linfoma não

hodgkiniano, respectivamente. O HERCEPTIN® é um anticorpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se liga selectivamente ao domínio extracelular do proto-oncogene do receptor 2 de factor de crescimento epidérmico humano (HER2). A sobre-expressão da proteína HER2 é observada em 25-30% dos cancros da mama primários. O RITUXAN® é um anticorpo monoclonal quimérico murino/humano geneticamente manipulado dirigido contra o抗igénio CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais e malignos. Ambos estes anticorpos são produzidos em células CHO.

A utilização de conjugados anticorpo-fármaco para a entrega local de agentes citotóxicos ou citostáticos, i.e. fármacos para matar ou inibir células tumorais no tratamento do cancro (Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; patente U.S. 4975278) permite a entrega direcionada da porção de fármaco a tumores, e a sua acumulação intracelular neles, enquanto a administração sistémica destes agentes fármacos não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para as células normais assim como as células tumorais que se pretende eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Procura-se desse modo a eficácia máxima com a toxicidade mínima. Tanto anticorpos policloniais como anticorpos monoclonais foram reportados como úteis nestas estratégias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Os fármacos utilizados nestes métodos incluem daunomicina, doxorrubicina, metotrexato e vindesina (Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986)). As toxinas utilizadas em conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas tais como a toxina diftérica, toxinas de plantas tais como ricina, toxinas de molécula pequena tais como geldanamicina (Kerr et al. (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784; Mandler et al. (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinóides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), e caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer*

Res. 53:3336-3342). As toxinas podem efectuar os seus efeitos citotóxicos e citostáticos através de mecanismos incluindo ligação a tubulina, ligação a ADN ou inibição de topoisomerase (Meyer, D.L. e Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" em *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237). Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inactivos ou menos activos quando conjugados com grandes anticorpos ou ligandos de receptores de proteínas.

O ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) é um conjugado anticorpo-radioisótopo composto por um anticorpo monoclonal IgG1 capa murino dirigido contra o antigénio CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais e malignos e radioisótopo ¹¹¹In ou ⁹⁰Y ligado por um ligante-quelante de tioureia (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Embora o ZEVALIN tenha actividade contra o linfoma não hodgkiniano (NHL) de células B, a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos pacientes. O MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), um conjugado de anticorpo e fármaco composto por um anticorpo huCD33 ligado a caliqueamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento de leucemia mielóide aguda por injecção (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patentes US 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). O cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto pelo anticorpo huC242 ligado através do ligante de dissulfureto SPP à porção de fármaco maitansinóide, DM1, está a ser desenvolvido para o tratamento de cancros que expressam o antigénio CanAg, tais como o cancro do cólon, pancreático, gástrico e outros. O MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto pelo anticorpo monoclonal anti-antigénio membranar específico da próstata (PSMA) ligado à porção de fármaco maitansinóide, DM1, está em desenvolvimento para o potencial tratamento de tumores da próstata. A mesma porção de fármaco maitansinóide, DM1, foi ligada através de um ligante que não de dissulfureto, SMCC, a um anticorpo monoclonal murino de ratinho, TA.1 (Chari et al. (1992) *Cancer Research* 52:127-131). Este conjugado foi reportado como sendo 200 vezes menos potente do que o

correspondente conjugado com ligante de dissulfureto. O ligante SMCC foi considerado aí como sendo "não clivável."

Vários compostos peptídicos curtos foram isolados a partir do molusco marinho, *Dolabella auricularia*, e verificou-se que tinham actividade biológica (Pettit et al. (1993) *Tetrahedron* 49:9151; Nakamura et al. (1995) *Tetrahedron Letters* 36:5059-5062; Sone et al. (1995) *Journal Org Chem.* 60:4474). Foram também preparados análogos destes compostos, e verificou-se que alguns possuem actividade biológica (para uma revisão, veja-se Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277). Por exemplo, a auristatina E (US 5635483) é um análogo sintético do produto natural marinho Dolastatina 10, um agente que inibe a polimerização de tubulina por ligação ao mesmo local na tubulina que o fármaco anticanceroso vincristina (G.R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79). A dolastatina 10, a auristatina PE e a auristatina E são péptidos lineares possuindo quatro aminoácidos, três dos quais são únicos para a classe de compostos da dolastatina, e uma amida C-terminal.

Os péptidos de auristatina, auristatina E (AE) e monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, foram conjugados com: (i) anticorpos monoclonais quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y nos carcinomas); (ii) cAC10 que é específico para CD30 em malignidades hematológicas (Klussman, et al. (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco et al. (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) anticorpos anti-CD20 tais como Rituxan® (rituximab) (WO 04/032828) para o tratamento de cancros que expressam CD20 e desordens imunitárias; (iv) anticorpos 2H9 anti-EphB2, e anti-IL-8 para tratamento de cancro colorrectal (Mao, et al. (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) anticorpo para E-selectina (Bhaskar et al. (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394); e (vi) outros anticorpos anti-CD30 (WO 03/043583). A monometilauristatina (MMAE) foi também conjugada com 2H9, um anticorpo contra EphB2R que é uma tirosina-quinase receptora TM do tipo I com homologia próxima entre ratinho e humano, e é sobre-expresso em células de cancro colorrectal (Mao et al. (2004) *Cancer Res.* 64:781-788).

A monometilauristatina MMAF, uma variante de auristatina E (MMAE) com uma fenilalanina no terminal C (US 5767237; US 6124431), foi reportada como sendo menos potente do que a MMAE, mas mais potente quando conjugada com anticorpos monoclonais (Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, apresentado em 28 de Março, 2004). A auristatina F fenilenodiamina (AFP); uma variante de fenilalanina da MMAE foi ligada a um mAb anti-CD70, 1F6, através do terminal C de 1F6 por via de um espaçador de fenilenodiamina (Law et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 625, apresentado em 28 de Março, 2004).

Existe uma necessidade na especialidade de fármacos adicionais para tratar vários cancros tais como cancros e metástases de cancros na próstata, no pulmão e no cólon. Os fármacos particularmente úteis para este propósito incluem conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 e fármaco direcionados para células da próstata, do pulmão ou do cólon, possuindo uma toxicidade significativamente menor, e ainda eficiência terapêutica útil. Estas e outras limitações e problemas do passado são abordados pela presente invenção.

A recitação de qualquer referência no presente pedido não é uma admissão de que a referência constitui anterioridade relativamente ao presente pedido.

SUMÁRIO

A invenção proporciona polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1, vectores, células hospedeiras, métodos de preparação de anticorpos anti-STEAP-1, imunoconjugados, conjugados anticorpo-fármaco, formulações farmacêuticas, anticorpos anti-STEAP-1 e métodos de utilização dos mesmos, como definido nas reivindicações.

Na presente divulgação, é proporcionado um anticorpo que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2A (SEQ ID NO:6) ou um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2B (SEQ ID NO:9). Na divulgação, é proporcionado um anticorpo que se liga a STEAP-1, em que o

anticorpo comprehende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2A (SEQ ID NO:6) e um domínio variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2B (SEQ ID NO:9).

Na divulgação, é proporcionado um anticorpo que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo comprehende um domínio variável da cadeia pesada possuindo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOS:9 ou 10. O anticorpo pode compreender um domínio variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:10. O anticorpo pode compreender uma região de esqueleto 1 de um domínio variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:25.

O anticorpo pode compreender um domínio variável da cadeia leve possuindo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. O anticorpo pode compreender um domínio variável da cadeia leve de SEQ ID NO:6.

É proporcionado um anticorpo que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo comprehende um domínio variável da cadeia pesada possuindo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9 ou 10. O anticorpo pode compreender um domínio variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:10. O anticorpo pode compreender uma região de esqueleto 1 de um domínio variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:25. O anticorpo pode compreender ainda um domínio variável da cadeia leve possuindo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. O anticorpo pode compreender um domínio variável da cadeia leve de SEQ ID NO:6.

Em determinadas concretizações, é proporcionado um polinucleótido de acordo com a reivindicação 1. Numa concretização, é proporcionado um vector compreendendo o polinucleótido. Numa concretização, é proporcionada uma célula hospedeira compreendendo o vector. Numa concretização, a célula hospedeira é eucariota. Numa concretização, a célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Numa concretização, é proporcionado um método de preparação de um anticorpo anti-STEAP-1, em que o método compreende a cultura da célula hospedeira sob condições adequadas para a expressão do polinucleótido que codifica o anticorpo, e o isolamento do anticorpo.

Num aspecto, é proporcionado um anticorpo de acordo com a reivindicação 7 ou a reivindicação 11, que se liga a STEAP-1 expressa na superfície de uma célula. Numa concretização, o anticorpo liga-se a um epítopo no interior de uma região de STEAP-1 humana ou de ratinho. Numa concretização, a célula é uma célula de mamífero. Numa concretização, a célula é uma célula humana. Numa concretização, a célula é uma célula de cancro. Numa concretização a célula é uma célula da próstata, do pulmão ou do cólon. Numa concretização a célula de cancro é uma célula de cancro da próstata. Em outra concretização, a célula é de uma metástase de um cancro primário da próstata, do pulmão ou do cólon.

O anticorpo é um anticorpo monoclonal. Numa concretização, o anticorpo é um fragmento de anticorpo seleccionado entre um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv ou (Fab')₂. O anticorpo é humanizado.

Na presente divulgação, é proporcionado um método de detecção da presença de STEAP-1 numa amostra biológica, o método compreendendo o contacto da amostra biológica com qualquer dos anticorpos anteriores sob condições permissivas para ligação do anticorpo a STEAP-1, e a detecção se é formado um complexo entre o anticorpo e STEAP-1. A amostra biológica pode compreender células da próstata. A amostra biológica pode ser de um mamífero que sofre ou se suspeita que sofre de uma desordem celular na próstata e/ou uma desordem proliferativa celular de células ou tecidos incluindo, mas não se lhes limitando, cancro da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga e ovariano e sarcoma

de Ewing assim como metástases de cancros primários da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga e ovariano e sarcoma de Ewing. Veja-se, por exemplo, (veja-se a Patente US 6,329,503; e Rodeberg, D.A. et al., *Clin. Cancer Res.* 11(12):4545-4552 (2005)).

Na presente divulgação é proporcionado um método de diagnóstico de uma desordem proliferativa celular associada a expressão aumentada de STEAP-1, o método compreendendo o contacto de uma célula de teste com qualquer dos anticorpos anteriores; a determinação do nível de expressão de STEAP-1 por detecção da ligação do anticorpo a STEAP-1; e a comparação do nível de expressão de STEAP-1 pela célula de teste com o nível de expressão de STEAP-1 por uma célula de controlo, em que um nível superior de expressão de STEAP-1 pela célula de teste em comparação com a célula de controlo indica a presença de uma desordem proliferativa celular associada a expressão aumentada de STEAP-1. A célula de teste pode ser uma célula de um paciente que se suspeita possuir uma desordem proliferativa celular, tal como uma desordem proliferativa da próstata. A desordem proliferativa celular pode ser seleccionada entre desordens celulares da próstata incluindo, mas não se lhes limitando, cancro da próstata. O método pode compreender a determinação do nível de expressão de STEAP-1 na superfície da célula de teste (tal como, por exemplo, uma célula de cancro da próstata) e a comparação do nível de expressão de STEAP-1 na superfície da célula de teste com o nível de expressão de STEAP-1 na superfície da célula de controlo (tal como, por exemplo, uma célula normal da próstata outra que não uma célula da próstata em proliferação anormal).

É proporcionado um método de diagnóstico de uma desordem proliferativa celular associada a um aumento de células, tais como células da próstata, que expressam STEAP-1, o método compreendendo o contacto de células de teste numa amostra biológica com qualquer dos anticorpos anteriores; a determinação do nível de anticorpo ligado às células de teste na amostra por detecção da ligação do anticorpo a STEAP-1; e a comparação do nível de anticorpo ligado a células numa amostra de controlo, em que o nível de anticorpo ligado é normalizado relativamente ao número de células que expressam STEAP-1 nas amostras de teste e de controlo, e em que um nível superior de

anticorpo ligado na amostra de teste em comparação com a amostra de controlo indica a presença de uma desordem proliferativa celular associada a células que expressam STEAP-1.

É também proporcionado um método de detecção de STEAP-1 solúvel em sangue ou soro, o método compreendendo o contacto de uma amostra de teste de sangue ou soro de um mamífero que se suspeita sofrer de uma desordem proliferativa celular na próstata com um anticorpo anti-STEAP-1 da invenção e a detecção de uma aumento na STEAP-1 solúvel na amostra de teste relativamente a uma amostra de controlo de sangue ou soro de um mamífero normal. O método de detecção pode ser útil como um método de diagnóstico de uma desordem proliferativa celular na próstata associada com um aumento na STEAP-1 solúvel em sangue ou soro de um mamífero.

Num aspecto, os anticorpos da invenção incluem anticorpos manipulados com cisteína como definido na reivindicação 11, onde um ou mais aminoácidos de um anticorpo progenitor estão substituídos por um aminoácido de cisteína livre como divulgado em WO2006/034488. Um anticorpo manipulado com cisteína comprehende um ou mais aminoácidos de cisteína livre possuindo um valor de reactividade de tiol na gama de 0,6 a 1,0. Um aminoácido de cisteína livre é um resíduo de cisteína que foi manipulado no anticorpo progenitor e não faz parte de uma ponte de dissulfureto. Os anticorpos manipulados com cisteína são úteis para a fixação de compostos citotóxicos e/ou imaciológicos no local da cisteína manipulada através de, por exemplo, uma maleimida ou um halogenoacetilo. A reactividade nucleófila da funcionalidade tiol de um resíduo Cys com um grupo maleimida é cerca de 1000 vezes superior comparativamente com qualquer outra funcionalidade de aminoácido numa proteína, tal como o grupo amino dos resíduos de lisina ou o grupo amino N-terminal. A funcionalidade específica de tiol em reagentes de iodoacetilo e maleimida pode reagir com grupos amino, mas são necessários, um pH superior (>9,0) e tempos de reacção mais longos (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London).

Os anticorpos manipulados com cisteína podem ser úteis no tratamento do cancro e incluem anticorpos específicos para receptores da superfície celular e transmembranares, e

antigénios associados a tumores (TAA). Estes anticorpos podem ser utilizados na forma de anticorpos nus (não conjugados com um fármaco ou a uma porção marcadora) ou na forma de conjugados anticorpo-fármaco (ADC). Os anticorpos manipulados com cisteína da invenção podem ser acoplados de modo específico do local e eficientemente com um reagente reactivo com tiol. O reagente reactivo com tiol pode ser um reagente ligante multifuncional, um reagente marcador de captura, um reagente fluoróforo ou um intermediário fármaco-ligante. O anticorpo manipulado com cisteína pode ser marcado com um marcador detectável, immobilizado sobre um suporte de fase sólida e/ou conjugado com uma porção de fármaco. A reactividade de tiol pode ser generalizada a qualquer anticorpo onde a substituição de aminoácidos por aminoácidos de cisteína reactivos possa ser efectuada dentro das gamas na cadeia leve seleccionadas entre as gamas de aminoácidos: L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; e dentro das gamas na cadeia pesada seleccionadas entre as gamas de aminoácidos: H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127; e H-170 a H-184, e na região Fc dentro das gamas seleccionadas entre H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380; e H-395 a H-405, onde a numeração das posições de aminoácidos se inicia na posição 1 do sistema de numeração de Kabat (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) e continua depois sequencialmente como divulgado em WO 2006/034488. A reactividade de tiol pode também ser generalizada a determinados domínios de um anticorpo, tais como o domínio constante da cadeia leve (CL) e domínios constantes da cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. As substituições por cisteína que resultam em valores de reactividade de tiol de 0,6 e superiores podem ser feitas nos domínios constantes da cadeia pesada , , , e μ de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluindo as subclasses de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Estes anticorpos e as suas utilizações estão divulgados em WO 2006/034488.

Os anticorpos manipulados com cisteína da invenção preferivelmente retêm a capacidade de ligação ao antigénio das suas contrapartidas de anticorpo progenitoras de tipo selvagem. Assim, os anticorpos manipulados com cisteína são capazes de se ligar, de preferência especificamente, a antigénios. Estes

antigénios incluem, por exemplo, antigénios associados a tumores (TAA), proteínas receptoras da superfície celular e outras moléculas da superfície celular, proteínas transmembranares, proteínas de sinalização, factores reguladores da sobrevivência celular, factores reguladores da proliferação celular, moléculas associadas a (e.g., que se sabe ou suspeita contribuírem funcionalmente para) desenvolvimento de tecido ou diferenciação, linfóquinas, citóquinas, moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular, moléculas envolvidas na vasculogénese e moléculas associadas a (e.g., que se sabe ou suspeita contribuírem funcionalmente para) angiogénese.

Um anticorpo da invenção pode ser conjugado com outros agentes reactivos com tiol em que o grupo reactivo é, por exemplo, uma maleimida, uma iodoacetamida, um dissulfureto de piridilo, ou outro parceiro de conjugação reactivo com tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. em *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). O parceiro pode ser um agente citotóxico (e.g. uma toxina tal como doxorrubicina ou toxina de pertussis), um fluoróforo tal como um corante fluorescente como fluoresceína ou rodamina, um agente quelante para um metal de imagiologia ou radioterapêutico, um marcador ou rótulo de detecção de peptidilo ou não peptidilo, ou um agente modificador da depuração tal como vários isómeros de polietilenoglicol, um péptido que se liga a um terceiro componente, ou outro hidrato de carbono ou agente lipófilo.

Num aspecto, os anticorpos da invenção podem ser conjugados com qualquer porção marcadora que possa ser ligada covalentemente ao anticorpo através de uma porção reactiva, uma porção activada ou um grupo tiol reactivo de cisteína (Singh et al. (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. e Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). O marcador ligado pode funcionar para: (i) proporcionar um sinal detectável; (ii) interactuar com um

segundo marcador para modificar o sinal detectável proporcionado pelo primeiro ou o segundo marcadores, e.g. para obter FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência); (iii) estabilizar interacções ou aumentar a afinidade de ligação, com o antigénio ou o ligando; (iv) afectar a mobilidade, e.g. mobilidade electroforética ou permeabilidade celular através da carga, hidrofobicidade, formato ou outros parâmetros físicos, ou (v) proporcionar uma porção de captura, para modular a afinidade para com o ligando, a ligação anticorpo/antigénio ou a complexação iônica.

Os anticorpos manipulados com cisteína marcados podem ser úteis em ensaios de diagnóstico, e.g., para detecção da expressão de um antigénio de interesse em células, tecidos ou soro específicos. Para aplicações em diagnóstico, o anticorpo será tipicamente marcado com uma porção detectável. Estão disponíveis numerosos marcadores que podem ser genericamente agrupados nas seguintes categorias:

Radioisótopos (radionuclídos), tais como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At ou ^{213}Bi . Os anticorpos marcados com radioisótopos são úteis em experiências de imagiologia direcionadas a receptores. O anticorpo pode ser marcado com reagentes ligandos que se ligam, quelatam ou de outro modo se complexam com um radioisótopo de metal em que o reagente é reactivo com o tiol da cisteína manipulada do anticorpo, utilizando as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 e 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Os ligandos quelantes que podem complexar um ião metálico incluem DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA e TETA (Macrocylics, Dallas, TX). Os radionuclídos podem ser direcionados por via de complexação com os conjugados anticorpo-fármaco da invenção (Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Os reagentes ligantes tais como DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobenzil-DOTA) podem ser preparados pela reacção de aminobenzil-DOTA com ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado com isopropilcloroformiato (Aldrich), seguindo o procedimento de Axworthy et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807). Os reagentes DOTA-maleimida reagem com os aminoácidos de cisteína livres dos anticorpos manipulados com

cisteína e proporcionam um ligando complexante de metais no anticorpo (Lewis et al. (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86). Os reagentes marcadores ligantes quelantes tais como DOTA-NHS (mono(éster de N-hidroxissuccinimida) do ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra-acético) estão comercialmente disponíveis (*Macrocyclics*, Dallas, TX). A imagiologia direcccionada para receptores com anticorpos marcados com radionuclidos pode proporcionar um marcador de activação de vias por detecção e quantificação da progressiva acumulação de anticorpos em tecido tumoral (Albert et al. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Os radio-metais conjugados podem permanecer intracelulares após degradação lisossómica.

Os complexos metal-quelato adequados como marcadores de anticorpos para experiências de imagiologia estão divulgados: US 5,342,606; US 5,428,155; US 5,316,757; US 5,480,990; US 5,462,725; US 5,428,139; US 5,385,893; US 5,739,294; US 5,750,660; US 5,834,456; Hnatowich et al. (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al. (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al. (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al. (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al. (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al. (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al. (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al. (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al. (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo et al. (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al. (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al. (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al. (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al. (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al. (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

(b) Os marcadores fluorescentes tais como quelatos de terras-raras (quelato de európio), tipos de fluoresceína incluindo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; tipos de rodamina incluindo TAMRA; dansilo; Lissamina;

cianinas; ficoeritrinas; Vermelho Texas; e seus análogos. Os marcadores fluorescentes podem ser conjugados com anticorpos utilizando as técnicas divulgadas em *Current Protocols in Immunology, supra*, por exemplo. Os corantes fluorescentes e reagentes marcadores fluorescentes incluem aqueles que estão comercialmente disponíveis da Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) e Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

(c) Vários marcadores enzima-substrato estão disponíveis ou divulgados (US 4275149). A enzima geralmente catalisa uma alteração química de um substrato cromogénico que pode ser medida utilizando várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma alteração de cor num substrato, que pode ser medida espectrofotometricamente. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou quimioluminescência do substrato. Estão descritas acima técnicas para a quantificação de uma alteração na fluorescência. O substrato quimioluminescente fica electronicamente excitado através de uma reacção química e pode então emitir luz que pode ser medida (utilizando um quimioluminómetro, por exemplo) ou doa energia a um aceitador fluorescente. Os exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (e.g., luciferase de pirilampo e luciferase bacteriana; US 4,737,456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinodionas, maleato-desidrogenase, urease, peroxidase tal como peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina (AP), -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases (e.g., glucose-oxidase, galactose-oxidase e glucose-6-fosfato-desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tais como uricase e xantina-oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase. Estão descritas técnicas para a conjugação de enzimas aos anticorpos em O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", em *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Os exemplos de combinações enzima-substrato incluem, por exemplo:

- (i) Peroxidase de rábano (HRP) com hidrogénio-peroxidase como substrato, em que a hidrogénio-peroxidase oxida um precursor de corante (e.g., ortofenilenodiamina (OPD) ou cloridrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

- (ii) fosfatase alcalina (AP) com fosfato de para-nitrofenilo como substrato cromogénico; e
- (iii) -D-galactosidase (-D-Gal) com um substrato cromogénico (e.g., p-nitrofenil- -D-galactosidase) ou um substrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- -D-galactosidase.

Numerosas outras combinações enzima-substrato estão disponíveis aos peritos na especialidade. Para uma revisão geral, veja-se US 4275149 e US 4318980.

Um marcador pode ser conjugado indirectamente com uma cadeia lateral de aminoácido, uma cadeia lateral de aminoácido activada ou um anticorpo manipulado com cisteína. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado com biotina e qualquer das três amplas categorias de marcadores acima mencionadas pode ser conjugada com avidina ou estreptavidina, ou vice-versa. A biotina liga-se selectivamente a estreptavidina e assim, o marcador pode ser conjugado com o anticorpo desta maneira indirecta. Alternativamente, para conseguir a conjugação indirecta do marcador com a variante polipeptídica, a variante polipeptídica é conjugada com um hapteno pequeno (e.g., digoxina) e um dos diferentes tipos de marcadores acima mencionados é conjugado com uma variante polipeptídica anti-hapteno (e.g., anticorpo anti-digoxina). Assim, pode ser conseguida a conjugação indirecta do marcador com a variante polipeptídica (Hermanson, G. (1996) em *Bioconjugate Techniques Academic Press*, San Diego).

Os anticorpos da presente invenção podem ser empregues em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ELISA, ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos e indirectos e ensaios de imunoprecipitação (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.).

Um marcador de detecção pode ser útil para a localização, visualização e quantificação de um evento de ligação ou reconhecimento. Os anticorpos marcados da invenção podem detectar receptores da superfície celular. Outra utilização para anticorpos marcados de forma detectável consiste num método de imunocaptura à base de contas compreendendo a conjugação de uma conta com um anticorpo marcado fluorescente e a detecção de

um sinal de fluorescência após a ligação de um ligando. Metodologias de detecção de ligação similares utilizam o efeito de ressonância plasmónica de superfície (SPR) para medir e detectar interacções anticorpo-antígeno.

Os marcadores de detecção tais como corantes fluorescentes e corantes quimioluminescentes (Briggs *et al.* (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino acids", *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058) proporcionam um sinal detectável e são geralmente aplicáveis marcação de anticorpos, preferivelmente com as propriedades seguintes: (i) o anticorpo marcado deverá produzir um sinal muito elevado com baixo ruido de fundo de modo a que pequenas quantidades de anticorpos possam ser detectadas com sensibilidade em ensaios tanto isentos de células como à base de células; e (ii) o anticorpo marcado deverá ser fotoestável de modo a que o sinal fluorescente possa ser observado, monitorado e registado sem fotobranqueamento significativo. Para aplicações que envolvem ligação na superfície celular de anticorpo marcado a membranas ou superfícies celulares, especialmente células vivas, os marcadores preferivelmente (iii) possuem boa solubilidade em água para conseguir uma concentração de conjugado eficaz e sensibilidade de detecção e (iv) não são tóxicos para células vivas de modo a não interromper os processos metabólicos normais das células ou causar morte celular prematura.

A quantificação directa da intensidade de fluorescência celular e a enumeração de eventos marcados por fluorescência, e.g. ligação na superfície celular de conjugados péptido-corante, podem ser conduzidas num sistema (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza a mistura-e-leitura, ensaios não radioactivos com células vivas ou contas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). As utilizações de anticorpos marcados também incluem ensaios de ligação a receptor da superfície celular, ensaios de imunocaptura, ensaios imunossorventes com ligação a fluorescência (FLISA), clivagem por caspase (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 95:618-23; US 6,372,907), apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) e ensaios de citotoxicidade. A tecnologia de ensaios fluorométricos em microvolumes pode ser utilizada para identificar a infra- ou supra-regulação de uma molécula que é direcionada para a superfície celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

Os anticorpos marcados da invenção são úteis como biomarcadores de imangiologia e sondas pelos vários métodos e técnicas de imangiologia biomédica e molecular tais como: (i) MRI (imangiologia por ressonância magnética); (ii) MicroCT (tomografia computadorizada); (iii) SPECT (tomografia computadorizada com emissão de fotão único); (iv) PET (tomografia com emissão de positrões) Chen et al. (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminescência; (vi) fluorescência; e (vii) ultrassonografia. A imunocintigrafia é um procedimento de imangiologia em que anticorpos marcados com substâncias radioactivas são administrados a um paciente animal ou humano e é obtida uma imagem de locais no corpo onde o antícorpo se localiza (US 6528624). Biomarcadores de imangiologia podem ser objectivamente medidos e avaliados como indicadores de processos biológicos normais, processos patogénicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Os biomarcadores podem ser de vários tipos: O Tipo I são marcadores da história natural de uma doença e correlacionam-se longitudinalmente com índices clínicos conhecidos, e.g. avaliação por MRI de inflamação sinovial na artrite reumatóide; Os marcadores do Tipo II capturam o efeito de uma intervenção de acordo com um mecanismo-de-acção, mesmo que o mecanismo possa não estar associado a um resultado clínico; os marcadores do Tipo III funcionam como pontos finais sub-rogados onde a alteração, ou o sinal, do biomarcador prevê um benefício clínico para "validar" a resposta direcionada, tal como a erosão óssea medida na artrite reumatóide por CT. Os biomarcadores de imangiologia podem assim proporcionar informação terapêutica farmacodinâmica (PD) cerca de: (i) expressão de uma proteína alvo, (ii) ligação de um produto

terapêutico à proteína alvo, i.e. selectividade, e (iii) dados de depuração e semivida farmacocinética. As vantagens dos biomarcadores de imagiologia *in vivo* relativamente aos biomarcadores laboratoriais incluem: tratamento não invasivo, quantificável, avaliação da totalidade do corpo, dosagem e avaliações repetitivas, i.e. múltiplos pontos de tempo, e efeitos potencialmente transferíveis de resultados pré-clínicos (animais pequenos) para clínicos (humanos). Para algumas aplicações, a bioimagiologia suplanta ou minimiza o número de experiências em animais em estudos pré-clínicos.

Os métodos de marcação de péptidos são bem conhecidos. Veja-se Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T.S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R.L. e Noyes, C.M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I e II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin e New York; e Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al. (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al. (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

Péptidos e proteínas marcados com duas porções, um repórter fluorescente e um extintor em proximidade suficiente para sofrerem transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Grupos repórter são tipicamente corantes fluorescentes que são excitados pela luz a um determinado comprimento de onda e transferem energia para um grupo aceitador, ou extintor, com o desvio de Stokes apropriado para emissão ao brilho máximo. Os corantes fluorescentes incluem moléculas com aromaticidade estendida, tais como fluoresceína e rodamina, e seus derivados. O repórter fluorescente pode ser parcialmente ou significativamente extinto pela porção

extintora num péptido intacto. Após clivagem do péptido por uma peptidase ou uma protease, pode ser medido um aumento detectável na fluorescência (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolitic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

Os anticorpos marcados da invenção podem também ser utilizados como um agente de purificação por afinidade. Neste processo, o antícorpo marcado é imobilizado numa fase sólida tal como resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na especialidade. O antícorpo imobilizado é colocado em contacto com uma amostra contendo o antígeno a purificar, e depois o suporte é lavado com um solvente adequado que irá remover substancialmente todo o material na amostra excepto o antígeno a purificar, que está ligado à variante polipeptídica imobilizada. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão de glicina, pH 5,0, que irá libertar o antígeno da variante polipeptídica.

Os reagentes de marcação tipicamente possuem uma funcionalidade reactiva que pode reagir (i) directamente com um tiol de cisteína de um antícorpo manipulado com cisteínas para formar o antícorpo marcado, (ii) com um reagente ligante para formar um intermediário ligante-marcador, ou (iii) com um antícorpo ligante para formar o antícorpo marcado. A funcionalidade reactiva dos reagentes de marcação inclui: maleimida, halogenoacetilo, éster succinimidílico de iodoacetamida (e.g. NHS, N-hidroxissuccinimida), isotiocianato, cloreto de sulfônico, 2,6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo e fosforamidito, embora possam também ser utilizados outros grupos funcionais.

Um grupo funcional reactivo exemplificativo é o éster de N-hidroxissuccinimído (NHS) de um grupo carboxílico substituinte de um marcador detectável, e.g. biotina ou um corante fluorescente. O éster NHS do marcador pode ser preparado, isolado, purificado e/ou caracterizado, ou pode ser formado *in situ* e feito reagir com um grupo nucleófilo de um antícorpo. Tipicamente, a forma carboxílico do marcador é activada por reacção com alguma combinação de um reagente de carbodiimida, e.g. diciclo-hexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, ou um reagente de urónio, e.g. TSTU

(tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametilurónio, HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio), ou HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio), um activador, tal como 1-hidroxibenzotriazole (HOBT), e N-hidroxissuccinimida para originar o éster NHS do marcador. Em alguns casos, o marcador e o anticorpo podem ser acoplados por activação *in situ* do marcador e reacção com o anticorpo para formar o conjugado marcador-anticorpo num só passo. Outros reagentes de activação e de acoplamento incluem TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,3,3-tetrametilurónio), TFFH (2-fluoro-hexafluorofosfato de N,N',N",N'''-tetrametilurónio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfónio, EEDQ (2-etoxy-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitíleno-2-sulfônio)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole, e halogenetos de arilsulfônico, e.g. cloreto de tri-isopropilbenzenossulfônico.

Compostos péptido de ligação a albumina-Fab da invenção:

Os anticorpos podem ser fundidos com uma proteína de ligação a albumina. A ligação plasma-proteína pode ser um meio eficaz para melhorar as propriedades farmacocinéticas de moléculas de vida curta. A albumina é a proteína mais abundante no plasma. Os péptidos de ligação a albumina sérica (ABP) podem alterar a farmacodinâmica de proteínas de domínios activos fundidas, incluindo alteração da assimilação, penetração e difusão nos tecidos. Estes parâmetros farmacodinâmicos podem ser modulados por selecção específica da sequência apropriada do péptido que se liga a albumina sérica (US 20040001827). Foram identificados uma série de péptidos de ligação a albumina por rastreio com exibição em fagos (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; WO 01/45746). Os compostos da invenção incluem sequências de ABP ensinadas por: (i) Dennis et al. (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043 nas Tabelas III e IV, página 35038; (ii) US 20040001827 em [0076] SEQ ID NOS: 9-22; e (iii) WO 01/45746 nas páginas 12-13. Os Péptidos de Ligação a Albumina (ABP)-Fab são manipulados por fusão de um péptido de ligação a albumina com, por exemplo, o terminal C da cadeia pesada de Fab numa razão estequiométrica

de 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Ficou mostrado que a associação destes ABP-Fab com albumina aumentou a semivida do anticorpo em mais de 25 vezes em coelhos e ratinhos. Os resíduos Cys reactivos acima descritos podem portanto ser introduzidos nestes ABP-Fab e utilizados para conjugação específica do local com fármacos citotóxicos seguindo-se estudos *in vivo* em animais.

As sequências de péptidos de ligação a albumina exemplificativas incluem, mas não se lhes limitando, as sequências de aminoácidos listadas em SEQ ID NOS:80-84.

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:80
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:81
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:82
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO:83
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO:84

Conjugados Anticorpo-Fármaco

Noutro aspecto, a invenção proporciona imunoconjugados, ou conjugados anticorpo-fármaco (ADC), compreendendo um anticorpo conjugado com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, um fármaco, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (*e.g.*, uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioactivo (*i.e.*, um radioconjunto). São aqui também descritos métodos de utilização dos imunoconjugados. Num aspecto, os anti-STEAP-1 podem ser anticorpos covalentemente ligados a um agente citotóxico ou a um agente detectável como definido nas reivindicações.

A utilização de conjugados anticorpo-fármaco para a entrega local de agentes citotóxicos ou citostáticos, *i.e.* fármacos para matar ou inibir células tumorais no tratamento de cancro (Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; Patente U.S. 4,975,278) permite a entrega direcionada da porção de fármaco a tumores, e a acumulação intracelular neles, quando a administração sistémica destes agentes fármaco não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para células normais assim como as células tumorais que se pretende eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15,

1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Procura-se assim a máxima eficácia com o mínimo de toxicidade. Tanto anticorpos policlonais como anticorpos monoclonais foram reportados como úteis nestas estratégias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Os fármacos utilizados nestes métodos incluem daunomicina, doxorrubicina, metotrexato e vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). As toxinas utilizadas em conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas tais como toxina diftérica, toxinas de plantas tais como ricina, toxinas de molécula pequena tais como geldanamicina (Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinóides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) e caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). As toxinas podem fazer os seus efeitos citotóxicos e citostáticos através de mecanismos incluindo ligação a tubulina, ligação a ADN ou inibição de topoisomerase. Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inactivos ou menos activos quando conjugados com anticorpos grandes ou ligados de receptores de proteínas.

O ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) é um conjugado anticorpo-radioisótopo composto por um anticorpo monoclonal IgG1 capa de murino dirigido contra o抗igénio CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais e malignos e radioisótopo ¹¹¹In ou ⁹⁰Y ligado por um quelante ligante de tioureia (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Embora o ZEVALIN tenha actividade contra linfoma não hodgkiniano (NHL) de células B, a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos pacientes. O MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), um conjugado de anticorpo e fármaco composto por um anticorpo huCD33 ligado a caliqueamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento de leucemia mielóide aguda por injecção (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patentes US 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762;

5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). O cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto pelo anticorpo huC242 ligado através do ligante de dissulfureto SPP à porção de fármaco maitansinóide, DM1, está a avançar para ensaios de Fase II para o tratamento de cancros que expressam CanAg, tais como do cólon, pancreático, gástrico e outros. O MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto pelo anticorpo monoclonal anti-antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) ligado à porção de fármaco maitansinóide, DM1, está em desenvolvimento para o potencial tratamento de tumores da próstata. Os péptidos de auristatina, auristatina E (AE) e monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, foram conjugados com anticorpos monoclonais quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y em carcinomas) e cAC10 (específicos para CD30 em malignidades hematológicas) (Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) e estão em desenvolvimento terapêutico.

Estão aqui descritos agentes quimioterapêuticos úteis na geração de imunoconjungados. Toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia A da difteria, fragmentos activos não ligantes de toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina, cadeia A da abrina, cadeia A da modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, e os tricotecenos. Veja-se, e.g., WO 93/21232 publicado em 28 de Outubro, 1993. Estão disponíveis uma variedade de radionuclídos para a produção de anticorpos radioconjungados. Os exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re . Os conjungados do anticorpo e do agente citotóxico são preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tais como suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)-hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais

como bis-(p-diazónio-benzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos bis-activos de flúor (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.* (1987) *Science*, 238:1098. O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um agente quelante exemplificativo para a conjugação de radionucleótidos com o anticorpo (WO94/11026).

Conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de molécula pequena, tais como uma caliqueamicina, maitansinóides, dolastatinas, auristatinas, um tricoteceno e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm actividade de toxina, são também aqui contemplados.

Maitansina e maitansinóides

Um anticorpo (comprimento completo ou fragmentos) pode ser conjugado com uma ou mais moléculas de maitansinóide.

Os maitansinóides são inibidores mitóticos que actuam por inibição da polimerização da tubulina. A maitansina foi pela primeira vez isolada do arbusto da África oriental *Maytenus serrata* (Patente U.S. 3896111). Subsequentemente, verificou-se que determinados micróbios também produzem maitansinóides, tais como maitansinol e ésteres em C-3 de maitansinol (Patente U.S. 4,151,042). O maitansinol sintético e seus derivados e análogos estão divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; e 4,371,533.

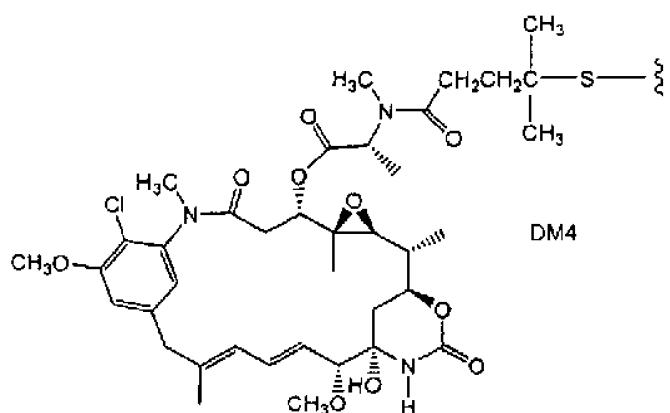
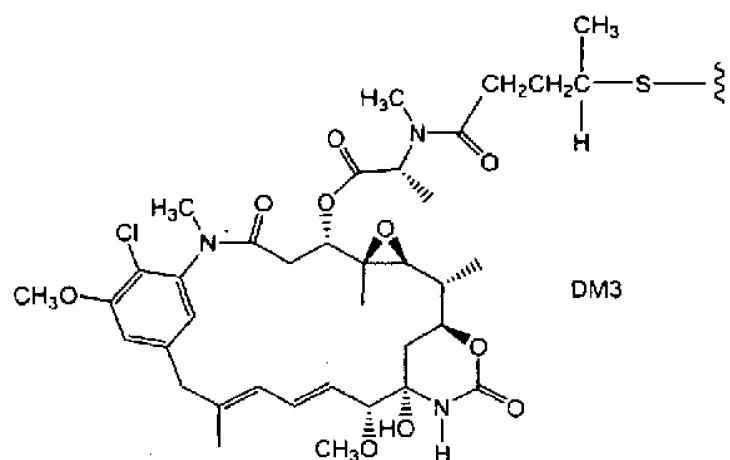
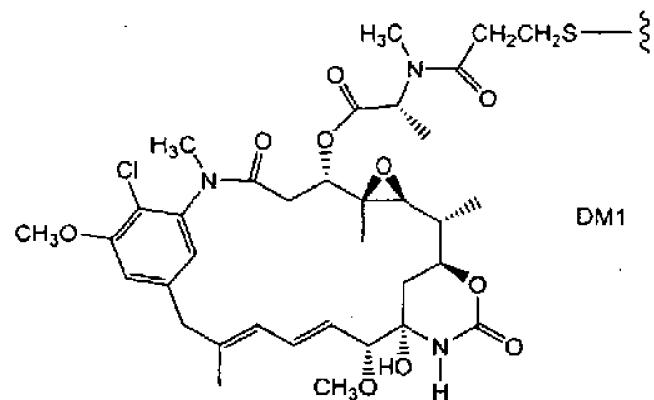
As porções de fármaco maitansinóide são porções de fármaco atractivas em conjugados de anticorpo e fármaco pois são: (i) de preparação relativamente acessível por fermentação ou modificação química, derivatização de produtos de fermentação, (ii) susceptíveis de derivatização com grupos funcionais adequados para conjugação através dos ligantes não dissulfureto com anticorpos, (iii) estáveis no plasma, e (iv) eficazes contra uma variedade de linhas de células tumorais.

Os compostos de maitansina adequados para utilização como porções de fármaco maitansinóide são bem conhecidos na especialidade, e podem ser isolados a partir de fontes naturais de acordo com métodos conhecidos, produzidos utilizando técnicas de engenharia genética (veja-se Yu et al. (2002) *PNAS* 99:7968-7973), ou maitansinol e análogos de maitansinol preparados sinteticamente de acordo com métodos conhecidos.

As porções de fármaco maitansinóide exemplificativas incluem as que possuem um anel aromático modificado, tais como: C-19-descloro (US 4256746) (preparado por redução com hidreto de alumínio e lítio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (ou C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (Pat. US 4361650 e 4307016) (preparados por desmetilação utilizando *Streptomyces* ou *Actinomyces* ou descloração utilizando LAH); e C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Pat. U.S. 4,294,757) (preparados por acilação utilizando cloretos de acilo), e os que possuem modificações em outras posições

As porções de fármaco maitansinóide exemplificativas também incluem as que possuem modificações tais como: C-9-SH (US 4424219) (preparadas pela reacção de maitansinol com H₂S ou P₂S₅); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH₂OR) (US 4331598); C-14-hidroximetilo ou aciloximetilo (CH₂OH ou CH₂OAc) (US 4450254) (preparadas a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (US 4,364,866) (preparadas pela conversão de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (Pat. US 4,313,946 e 4,315,929) (isoladas de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (Pat. US 4,362,663 e 4,322,348) (preparadas pela desmetilação de maitansinol por *Streptomyces*); e 4,5-desoxi (US 4371533) (preparadas pela redução com tricloreto de titânio/LAH de maitansinol).

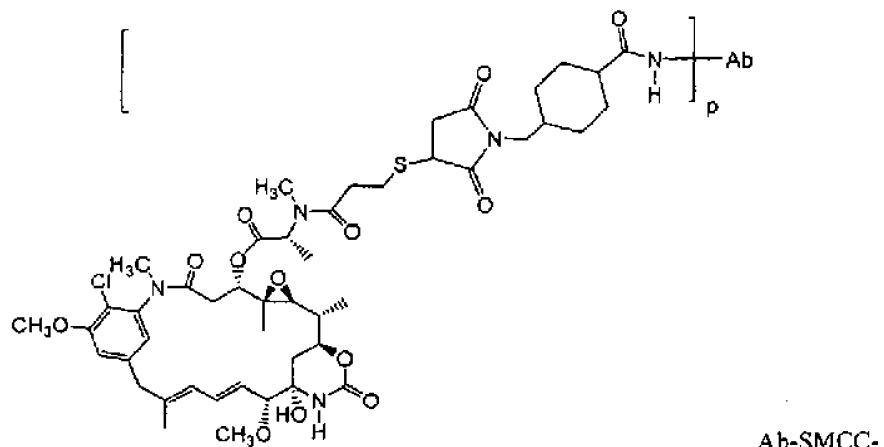
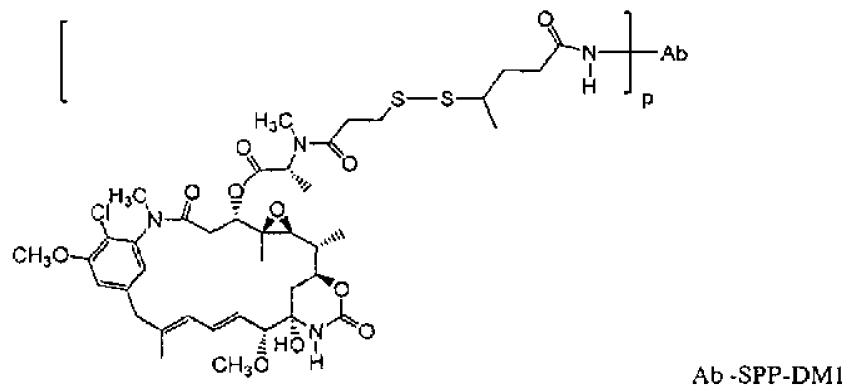
Porções de fármaco maitansinóide exemplificativas incluem: DM1; DM3; e DM4, possuindo as estruturas:



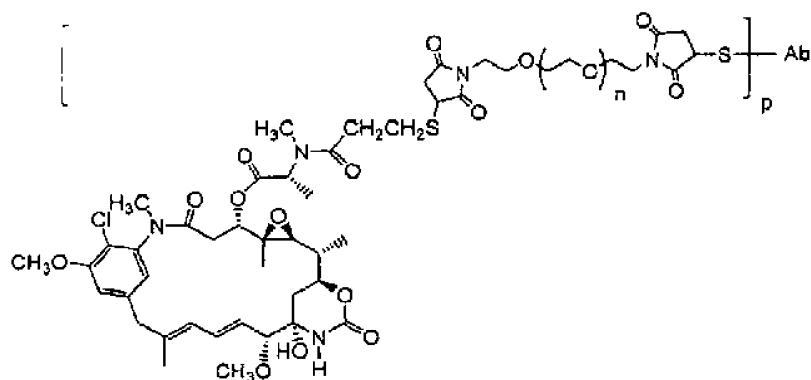
em que a linha ondulada indica a fixação covalente do átomo de enxofre do fármaco a um ligante (L) de um conjugado de anticorpo e fármaco. O HERCEPTIN® (trastuzumab) ligado por SMCC a DM1 foi reportado (WO 2005/037992).

Um conjugado de anticorpo e fármaco da presente invenção pode ser preparado de acordo com os procedimentos aqui divulgados.

Outros conjugados de anticorpo e fármaco maitansinóide exemplificativos possuem as seguintes estruturas e abreviaturas, (em que Ab é anticorpo e p é de 1 a cerca de 8):



Os conjugados de anticorpo e fármaco exemplificativo em que DM1 está ligado através de um ligante BMPEO a um grupo tiol do anticorpo possuem a estrutura e a abreviatura:



onde Ab é anticorpo; n é 0, 1 ou 2; e p é 1, 2, 3 ou 4.

Os imunoconjugados contendo maitansinóides, métodos para os preparar, e sua utilização terapêutica, estão divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 e Patente Europeia EP 0 425 235 B1.

Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) descreveram imunoconjugados compreendendo um maitansinóide designado DM1 ligado ao anticorpo monoclonal C242 dirigido contra cancro colorrectal humano. Verificou-se que o conjugado é altamente citotóxico para células de cancro do cólon em cultura, e apresentou actividade antitumoral num ensaio de crescimento tumoral *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) descrevem imunoconjugados em que um maitansinóide foi conjugado através de um ligante de dissulfureto ao anticorpo murino A7 que se liga a um抗igénio em linhas celulares de cancro do cólon humano, ou a outro anticorpo monoclonal murino TA.1 que se liga ao oncogene HER-2/neu. A citotoxicidade do conjugado TA.1-maitansonóide foi testada *in vitro* na linha celular de cancro da mama humano SK-BR-3, que expressa 3×10^5 抗igénios de superfície HER-2 por célula. O conjugado de fármaco conseguiu um grau de citotoxicidade similar ao do fármaco maitansinóide livre, que podia ser aumentado aumentando o número de moléculas de maitansinóide por molécula de anticorpo. O conjugado A7-maitansinóide apresentou baixa citotoxicidade sistémica em ratinhos.

Os conjugados anticorpo anti-STEAP-1-maitansinóide são preparados por ligação química de um anticorpo a uma molécula de maitansinóide sem diminuição significativa da actividade biológica do anticorpo ou da molécula de maitansinóide. Veja-se, e.g., a Patente U.S. 5,208,020. Uma média de 3-4 moléculas de maitansinóide conjugadas por molécula de anticorpo apresentou eficácia no aumento da citotoxicidade de células alvo sem afectar negativamente a função ou a solubilidade do anticorpo, embora seja expectável que mesmo uma só molécula de toxina/anticorpo aumente a citotoxicidade relativamente à utilização de anticorpo nu. Os maitansinóides são bem conhecidos na especialidade e podem ser sintetizados por técnicas

conhecidas ou isolados a partir de fontes naturais. Os maitansinóides adequados são divulgados, por exemplo, na Patente U.S. 5,208,020 e nas outras patentes e publicações que não patentes referidas acima. Os maitansinóides preferidos são o maitansinol e análogos de maitansinol modificados no anel aromático ou em outras posições da molécula de maitansinol, tais como vários ésteres de maitansinol.

Existem muitos grupos ligantes conhecidos na especialidade para a preparação de conjugados anticorpo-maitansinóide, incluindo, por exemplo, os divulgados nas Patentes U.S. 5,208,020, 6,441,163, ou na Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992), e US 2005/0169933A1. Os conjugados anticorpo-maitansinóide compreendendo a componente ligante SMCC podem ser preparados como divulgado no Pedido de Patente U.S. 11/141344, apresentado em 31 de Maio, 2005, "Antibody Drug Conjugates and Methods" Publicação US 2005/0276812. Os grupos de ligação incluem grupos dissulfureto, grupos tioéter, grupos lábeis aos ácidos, grupos fotolábeis, grupos lábeis a peptidases ou grupos lábeis a esterases, como divulgado nas patentes acima identificadas. São aqui descritos e exemplificados grupos de ligação adicionais.

Conjugados do anticorpo e maitansinóide podem ser preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo-HCl), ésteres activos (tais como suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)-hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tais como bis-(p-diazóniobenzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Os agentes de acoplamento particularmente preferidos incluem 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) e 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar uma ligação dissulfureto.

O ligante pode ser ligado à molécula de maitansinóide em várias posições, dependendo do tipo de ligação. Por exemplo, pode ser formada uma ligação éster por reacção com um grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamento convencionais. A reacção pode ocorrer na posição C-3 possuindo um grupo hidroxilo, na posição C-14 modificada com hidroximetilo, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxilo, e na posição C-20 possuindo um grupo hidroxilo. Preferivelmente, a ligação é formada na posição C-3 do maitansinol ou de um análogo de maitansinol.

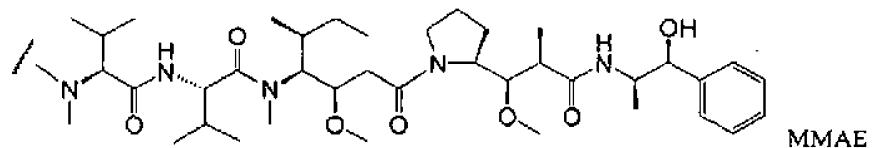
Os anticorpos (comprimento completo ou fragmentos) podem ser conjugados com uma ou mais moléculas de maitansinóide. O agente citotóxico D pode ser um maitansinóide DM1. O ligante pode ser seleccionado do grupo que consiste em SPDP, SMCC, IT, SPDP e SPP.

Auristatinas e dolostatinas

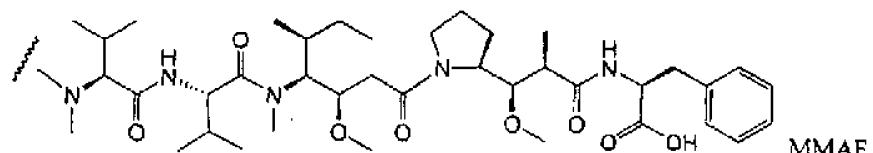
Um anticorpo pode ser conjugado com dolastatinas ou análogos peptídicos de dolostatina e derivados, as auristatinas (Patentes US 5,635,483; 5,780,588). Mostrou-se que as dolastatinas e as auristatinas interferem com a dinâmica dos microtúbulos, a hidrólise de GTP e a divisão nuclear e celular (Woyke *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) e possuem actividade anticancerosa (US 5,663,149) e antifúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). A porção de fármaco de dolastatina ou auristatina pode ser ligada ao anticorpo através do terminal N (amino) ou do terminal C (carboxilo) da porção de fármaco peptídico (WO 02/088172).

As concretizações de auristatina exemplificativas incluem as porções de fármaco monometilauristatina DE e DF ligadas ao terminal N, divulgadas em "Senter *et al.*, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, apresentado em 28 de Março, 2004.

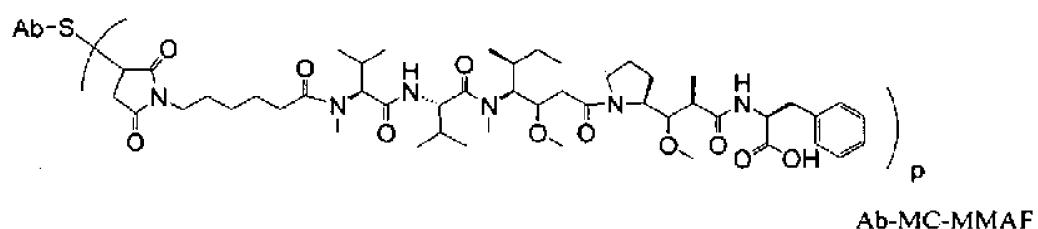
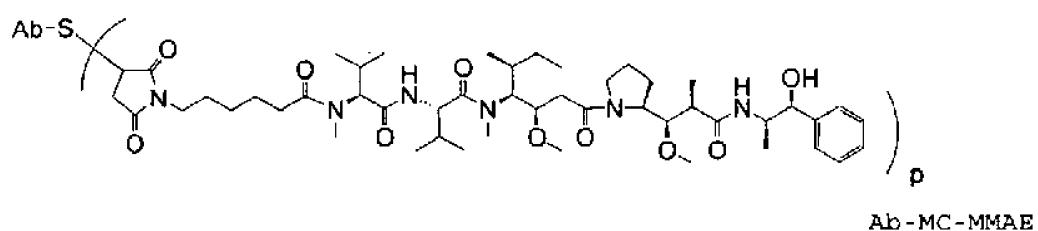
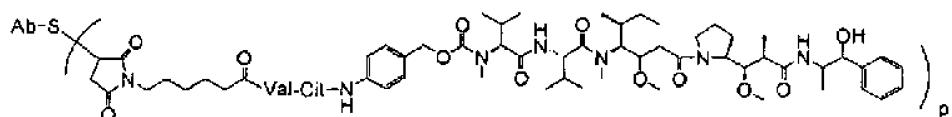
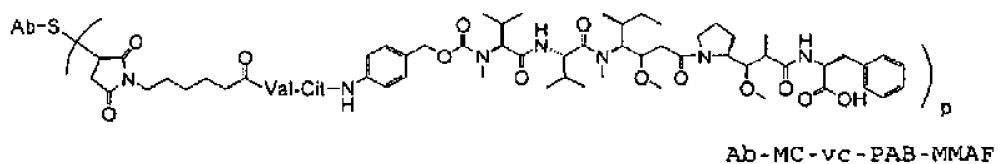
Uma concretização de auristatina exemplificativa é a MMAE (em que a linha ondulada indica a fixação covalente a um ligante (L) de um conjugado de anticorpo e fármaco).



Outra concretização exemplificativa de auristatina é a MMAF, em que a linha ondulada indica a fixação covalente a um ligante (L) de um conjugado de anticorpo e fármaco (US 2005/0238649) :



Concretizações exemplificativas adicionais compreendendo MMAE ou MMAF e várias componentes ligantes (aqui descritos adiante) possuem as seguintes estruturas e abreviaturas (em que Ab significa o anticorpo e p é de 1 a cerca de 8) :



Tipicamente, as porções de fármaco à base de péptidos podem ser preparadas por formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos. Estas ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese em fase líquida (veja-se E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química dos péptidos. As porções de fármaco de auristatina/dolastatina podem ser preparadas de acordo com os métodos de: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; e Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784.

Caliqueamicina

Um anticorpo pode ser conjugado com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos da caliqueamicina é capaz de produzir quebras de ADN de cadeia dupla em concentrações sub-picomolares. Para a preparação de conjugados da família da caliqueamicina, vejam-se as patentes US 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (todas da American Cyanamid Company). Os análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas não se lhes limitando, 1^1 , 2^1 , 3^1 , N-acetil- 1^1 , PSAG e 1_1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) e as supramencionadas patentes U.S. da American Cyanamid). Outro fármaco antitumoral com que o anticorpo pode ser conjugado é QFA que é um antifolato. Tanto a caliqueamicina como o QFA possuem locais de acção intracelulares e não atravessam prontamente a membrana plasmática. Portanto, a assimilação celular destes agentes através de internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente os seus efeitos citotóxicos.

Outros agentes citotóxicos

Outros agentes antitumorais que podem ser conjugados com os anticorpos incluem BCNU, estreptozenocina, vincristina e 5-fluorouracilo, a família de agentes conhecidos colectivamente como complexo LL-E33288 descrito nas patentes U.S. 5,053,394, 5,770,710, assim como esperamicinas (patente U.S. 5,877,296).

As toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia A da difteria, fragmentos activos não ligantes de toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina, cadeia A da abrina, cadeia A da modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, WO 93/21232 publicado em 28 de Outubro, 1993.

Está também contemplado um imunoconjunto formado entre um anticorpo e um composto com actividade nucleolítica (e.g., uma ribonuclease ou uma ADN-endonuclease tal como uma desoxirribonuclease; ADNase).

Para a destruição selectiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioactivo. Estão disponíveis uma variedade de isótopos radioactivos para a produção de anticorpos radioconjungados. Os exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Quando o conjugado é utilizado para a detecção, pode compreender um átomo radioactivo para estudos cintigráficos, por exemplo Tc^{99m} ou I¹²³, ou um marcador de spin para imagiologia por ressonância magnética nuclear (RMN) (também conhecida como imagiologia por ressonância magnética, irm), tais como iodo-123 novamente, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, azoto-15, oxigénio-17, gadolinio, manganês ou ferro.

Os radiomarcadores ou outros marcadores podem ser incorporados no conjugado de maneiras conhecidas. Por exemplo, o péptido pode ser biossintetizado ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adequados envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar de hidrogénio. Marcadores tais como Tc^{99m} ou I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ podem ser ligados através de um resíduo de cisteína no péptido. O ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método do IODOGEN (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 pode ser utilizado para incorporar iodo-123. "Monoclonal Antibodies in

"Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) descreve outros métodos com detalhes.

Os conjugados do anticorpo e do agente citotóxico podem ser preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tais como suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)-hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tais como diisocianatos de bis-(p-diazóniobenzoíl)etilenodiamina), (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno-triaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um agente quelante exemplificativo para conjugação de um radionucleórido ao anticorpo. Veja-se WO94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" que facilita a libertação do fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, pode-se utilizar um ligante lável aos ácidos, um ligante sensível à peptidase, um ligante fotolábil, um ligante de dimetilo ou um ligante contendo dissulfureto (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); Patente U.S. 5,208,020).

Os compostos contemplam ADC preparado com reagentes reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, e sulfo-SMPB, e SVSB ((4-vinilsulfono)benzoato de succinimidilo) que estão comercialmente disponíveis (e.g., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., E.U.A). Vejam-se as páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

Preparação de conjugados de anticorpo e fármaco:

Nos conjugados de anticorpo e fármaco (ADC) da invenção, um anticorpo (Ab) pode ser conjugado com 1 a 4 porções de fármaco (D), através de um ligante (L). Como o número de porções

de fármaco por anticorpo é tipicamente um número médio de todos os conjugados numa população de um conjugado de fármaco e anticorpo, o número de porções de fármaco por anticorpo pode não ser um número inteiro. O ADC de fórmula I pode ser preparado por várias vias, empregando reacções de química orgânica, condições e reagentes conhecidos dos peritos na especialidade, incluindo: (1) reacção de um grupo nucleófilo de um anticorpo com um reagente ligante bivalente, para formar Ab-L, através de uma ligação covalente, seguida por reacção com uma porção de fármaco D; e (2) reacção de um grupo nucleófilo de uma porção de fármaco com um reagente ligante bivalente, para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguida por reacção com o grupo nucleófilo de um anticorpo. São aqui descritos métodos adicionais para a preparação de ADC.

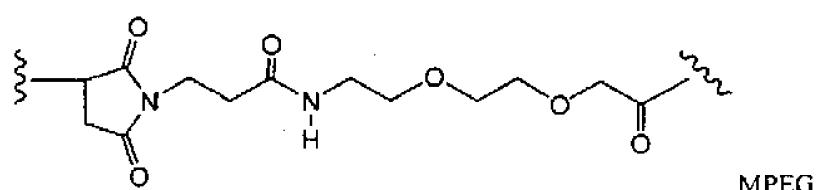
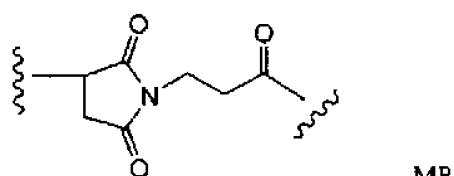
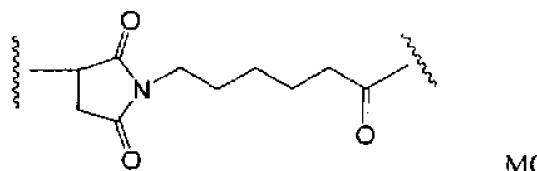
$\text{Ab}-(\text{L-D})_p$ Fórmula 1

O ligante pode ser composto por um ou mais componentes ligantes. As componentes ligantes exemplificativas incluem 6-maleimidocaproílo ("MC"), maleimidopropanoílo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxicarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclo-hexano-1-carboxilato ("SMCC") e N-Succinimidil-(4-iodoacetil)aminobenzoato ("SIAB"). Numa concretização, o ligante é valina-citrulina-p-aminobenziloxicarbonilo ("vc-PAB"). Componentes ligantes adicionais são conhecidos na especialidade e alguns são aqui descritos.

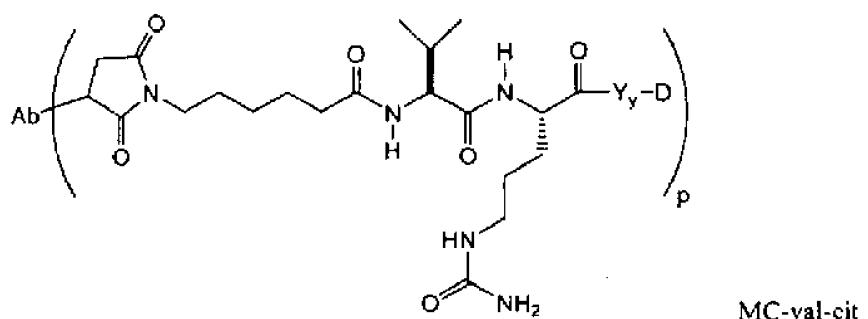
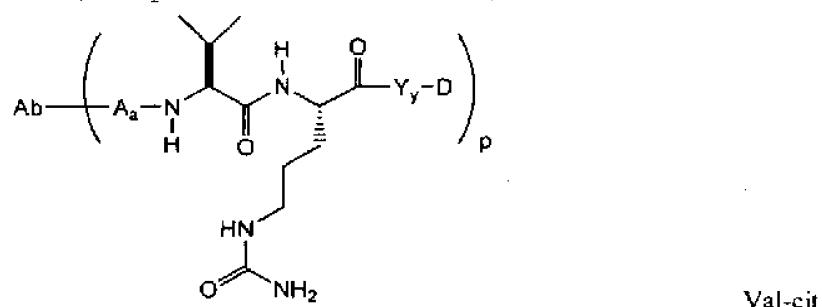
Em algumas concretizações, o ligante pode compreender resíduos de aminoácido. As componentes ligantes de aminoácidos exemplificativas incluem um dipéptido, um tripéptido, a tetrapéptido ou um pentapéptido. Os dipéptidos exemplificativos incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), alanina-fenilalanina (af ou ala-phe). Os tripéptidos exemplificativos incluem: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Os resíduos de aminoácido que constituem uma componente ligante de aminoácidos incluem os de ocorrência natural, assim como aminoácidos menores e análogos de aminoácidos que não de ocorrência natural, tais como a citrulina. As componentes ligantes de aminoácidos podem ser desenhadas e optimizadas na sua selectividade para clivagem

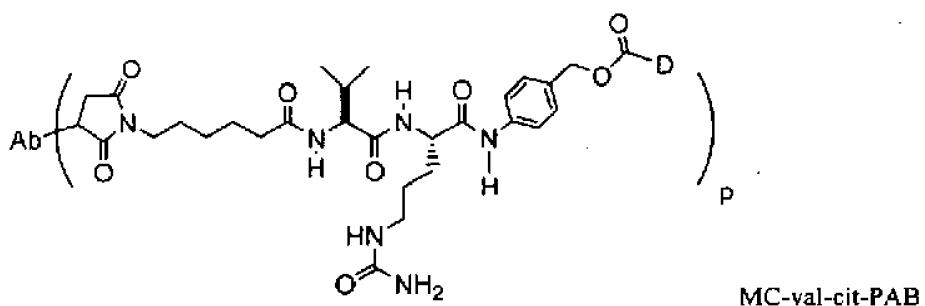
enzimática por enzimas particulares, por exemplo, uma protease associada a tumores, catepsina B, C e D, ou uma plasmina-protease.

As estruturas de componentes ligantes exemplificativas estão mostradas adiante (em que a linha ondulada indica locais de fixação covalente a outras componentes do ADC) :



Componentes ligantes exemplificativas adicionais e abreviaturas incluem (em que o anticorpo (Ab) e o ligante estão representados, e p é 1 a cerca de 8) :





Os grupos nucleófilos em anticorpos incluem, mas não se lhes limitam: (i) grupos amino N-terminais, (ii) grupos amino de cadeias laterais, e.g. lisina, (iii) grupos tiol de cadeias laterais, e.g. cisteína, e (iv) grupos hidroxilo ou amino de açúcares quando o antícorpo está glicosilado. Grupos amino, tiol e hidroxilo são nucleófilos e capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligantes e reagentes ligantes incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformiatos e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e de benzilo tais como halogenoacetamidas; (iii) grupos aldeído, cetona, carboxilo e maleimido. Certos anticorpos possuem dissulfuretos intercadeias susceptíveis de redução, i.e. pontes de cisteínas. Os anticorpos podem ser tornados reactivos para conjugação com reagentes ligantes por tratamento com um agente redutor tal como DTT (ditiotreitol). Cada ponte de cisteínas irá assim formar, teoricamente, dois nucleófilos de tiol reactivo. Podem ser introduzidos grupos nucleófilos adicionais nos anticorpos através da reacção de lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) que resulta na conversão de uma amina num tiol. Os grupos tiol reactivos podem ser introduzidos no antícorpo (ou seus fragmentos) por introdução de um, dois, três, quatro ou mais resíduos de cisteína (e.g., preparando anticorpos mutantes compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido de cisteína não nativos).

Os conjugados de antícorpo e fármaco da invenção podem também ser produzidos por modificação do antícorpo para introduzir porções electrófilas, que podem reagir com substituintes nucleófilos no reagente ligante ou no fármaco. Os açúcares de anticorpos glicosilados podem ser oxidados, e.g. com reagentes oxidantes de periodato, para formar grupos aldeído ou cetona que podem reagir com o grupo amino de reagentes

ligantes ou porções de fármaco. Os resultantes grupos imina de bases de Schiff podem formar uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, e.g. por reagentes de boro-hidreto para formar ligações amina estáveis. Numa concretização, a reacção da porção hidrato de carbono de um anticorpo glicosilado com galactose-oxidase ou meta-periodato de sódio pode originar grupos carbonilo (aldeído e cetona) na proteína que podem reagir com grupos apropriados no fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). Em outra concretização, proteínas contendo resíduos de serina ou de treonina N-terminais podem reagir com meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Este aldeído pode reagir com uma porção de fármaco ou um nucleófilo ligante.

Do mesmo modo, grupos nucleófilos numa porção de fármaco incluem, mas não se lhes limitando: grupos amino, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tio-semicarbazona, hidrazinocarboxilato e aril-hidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligantes e reagentes ligantes incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e de benzilo tais como halogenoacetamidas; (iii) grupos aldeído, cetona, carboxilo e maleimido.

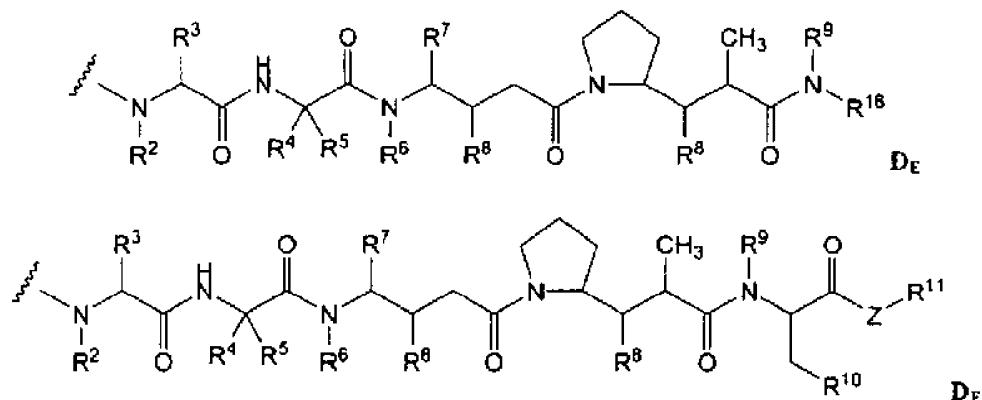
Os métodos para a conjugação de ligante-porções de fármaco a proteínas direcionadas para células tais como anticorpos, imunoglobulinas ou seus fragmentos encontram-se, por exemplo, em US 5,208,020; US 6,441,163; WO 2005037992; WO 2005081711; e WO 2006/034488.

Alternativamente, pode ser preparada uma proteína de fusão compreendendo o anticorpo e o agente citotóxico, e.g., por técnicas recombinantes ou síntese peptídica. O comprimento do ADN pode compreender regiões respectivas que codificam as duas porções do conjugado adjacentes uma em relação à outra ou separadas por uma região que codifica um péptido ligante que não destrói as propriedades desejadas do conjugado.

O anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcccionamento para

tumores em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguindo-se a remoção de conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de depuração e depois administração de um "ligando" (e.g., avidina) que está conjugado com um agente citotóxico (e.g., um radionucleótilo).

O agente citotóxico, D, pode ser uma auristatina de fórmula D_E ou D_F



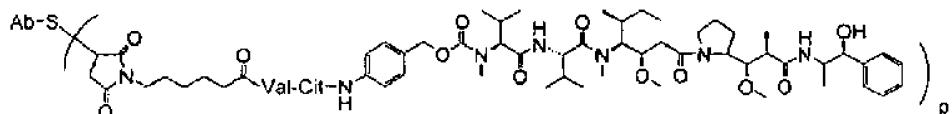
e em que R² e R⁶ são, cada um, metilo, R³ e R⁴ são, cada um isopropilo, R⁷ é sec-butilo, cada R⁸ é independentemente seleccionado entre CH₃, O-CH₃, OH e H; R⁹ é H; R¹⁰ é arilo; Z é -O- ou -NH-; R¹¹ é H, alquilo C₁-C₈ ou -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; e R¹⁸ é -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; e

(d) p varia de cerca de 1 a 8.

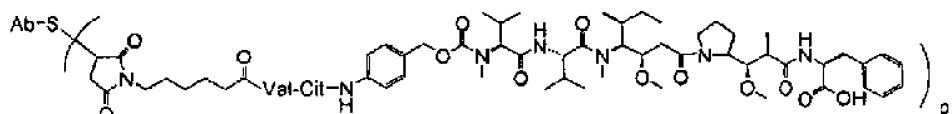
São adicionalmente proporcionadas as seguintes características para qualquer dos imunoconjungados anteriores. Numa concretização, um imunoconjungado possui actividade de morte celular *in vitro* ou *in vivo*. Numa concretização, o ligante é ligado ao anticorpo através de um grupo tiol no anticorpo. Numa concretização, o ligante é clivável por uma protease. Numa concretização, o ligante compreende um dipéptido val-cit. Numa concretização, o ligante compreende uma unidade p-aminobenzilo. Numa concretização, a unidade p-aminobenzilo está disposta entre o fármaco e um local de clivagem por protease no ligante. Numa concretização, a unidade p-aminobenzilo é p-aminobenziloxicarbonilo (PAB). Numa concretização, o ligante compreende 6-maleimidocaproílo. Numa concretização, o 6-maleimidocaproílo está disposto entre o anticorpo e um local de clivagem por protease no ligante. As concretizações anteriores

podem ocorrer singularmente ou em qualquer combinação umas com as outras.

Numa concretização, o fármaco é seleccionado entre MMAE e MMAF. Numa concretização, o conjugado anticorpo-fármaco possui a fórmula



em que Ab é o anticorpo anti-STEAP-1 como definido na reivindicação 11, S é um átomo de enxofre, e p varia de 1 a 4. Numa concretização, o imunoconjugado possui a fórmula



em que Ab é o anticorpo anti-STEAP-1 como definido na reivindicação 11. S é um átomo de enxofre, e p varia de 1 a 4.

Métodos de imagiologia com anticorpos marcados:

Em outra concretização da invenção, anticorpos manipulados com cisteína podem ser marcados através do tiol da cisteína com radionuclidos, corantes fluorescentes, porções de substrato que desencadeiam bioluminescência, porções de substrato que desencadeiam quimioluminescência, enzimas e outros marcadores de detecção para experiências de imagiologia com aplicações em diagnóstico, farmacodinâmicas e terapêuticas. Geralmente, o anticorpo marcado manipulado com cisteína, i.e. "biomarcador" ou "sonda", é administrado por injecção, perfusão ou ingestão oral a um organismo vivo, e.g. um ser humano, um roedor ou outro animal pequeno, um órgão perfundido ou uma amostra de tecido. A distribuição da sonda é detectada ao longo do tempo e é representada numa imagem.

Artigos de Fabrico:

É proporcionado um artigo de fabrico, ou "kit", contendo materiais úteis para o tratamento das desordens acima descritas. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo ou bula de embalagem sobre, ou associados ao recipiente. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos,

seringas, embalagem de *blister*, etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição de conjugado anticorpo-fármaco (ADC) que é eficaz para o tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma tampa perfurável por uma agulha de injecção hipodérmica). Pelo menos um agente activo na composição é um ADC. O rótulo ou bula de embalagem indicam que a composição é utilizada para o tratamento da condição de eleição, tal como o cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, o artigo de fabrico pode compreender ainda um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injecção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

Composições farmacêuticas:

Num aspecto, é proporcionada uma formulação farmacêutica compreendendo o conjugado como definido na reivindicação 14 (i) e um transportador farmaceuticamente aceitável. Num aspecto, são proporcionadas composições farmacêuticas para utilização num método de tratamento de um cancro da próstata, do pulmão ou do cólon. O cancro da próstata, do pulmão ou do cólon podem ser uma metástase de um cancro primário da próstata, do pulmão ou do cólon. O cancro pode estar associado a uma expressão aumentada de STEAP-1 na superfície de uma célula.

É proporcionado um método de inibição da proliferação celular, em que o método compreende a exposição de uma célula a qualquer dos imunoconjungados anteriores sob condições permissivas à ligação do imunoconjungado a STEAP-1. A célula da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing pode ser uma célula tumoral. A célula tumoral pode ser uma célula de tumor da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou uma célula de sarcoma de Ewing de um mamífero que sofre ou se suspeita que sofra de uma desordem proliferativa de células da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou de células de sarcoma de Ewing incluindo, mas não se lhes limitando, uma metástase de um tumor de cancro primário da

próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou de um tumor de sarcoma de Ewing. A célula da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou de sarcoma de Ewing pode ser um xenoenxerto. A exposição pode ocorrer *in vitro* ou *in vivo*.

É também proporcionado um método de utilização do anticorpo anti-STEAP-1 da invenção para o ensaio de STEAP-1 solúvel em soro num mamífero que sofre de uma desordem proliferativa celular da próstata, do pulmão ou do cólon (ou metástase de uma incidência primária desta desordem), medição da progressão ou regressão clínica das doenças, ou avaliação da carga ou relapso tumorais.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A patente ou pedido de patente contém pelo menos um desenho executado a cores. Cópias da publicação da patente ou do pedido de patente com figura(s) a cores serão proporcionados pelo Instituto por requerimento e pagamento das taxas necessárias.

A **Figura 1** representa a sequência de aminoácidos de STEAP-1 humana (SEQ ID NO:1) alinhada com STEAP-1 de ratinho e de macaco *Cynomolgus (cyno)* (SEQ ID NOS:2 e 3, respectivamente). Os domínios extracelulares 1, 2 e 3 estão rotulados e marcados por caixas sombreadas.

Figuras 2A-2B: A **Figura 2A** representa a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de anticorpo anti-STEAP-1 murino 120.545 alinhada com o anticorpo quimera (quimera 120) e anticorpo humanizado (enxerto 120) e alinhada com a sequência humana do subgrupo III. As CDR estão em caixas (CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3). As sequências que abraçam as CDR são as sequências de esqueleto ("Framework") (FR-L1 a FR-L4). As sequências estão numeradas de acordo com a numeração de Kabat. As CDR de Kabat, de Chothia e de contacto estão indicadas próximo das CDR em caixas. A **Figura 2B** representa a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de anticorpo anti-STEAP-1 murino (120.545) alinhada com o anticorpo quimera (quimera 120) e o anticorpo humanizado (enxerto 120) e alinhada com a sequência capa I humana. As variantes humanizadas 24, 37, 48, 67 e 37/48, 67, 71 e 78 foram preparadas fazendo as seguintes alterações de aminoácidos: A24V, V37I, V48M, F67I e L78F na cadeia pesada do anticorpo enxerto 120. As CDR estão em caixas.

As sequências FR-H1, FR-H2, FR-H3 e FR-H4 abraçam as CDR (CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3). As sequências estão numeradas de acordo com a numeração de Kabat. As CDR de Kabat, de Chothia e de contacto estão indicadas próximo das CDR em caixas.

As **Figuras 3A e 3B** mostram sequências de esqueleto de consenso variáveis pesadas (VH) humanas aceitadoras exemplificativas para utilização na prática da presente invenção com identificadores de sequência como se segue, onde as SEQ ID NO das FR estão enumeradas pela ordem FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

- esqueleto de consenso de VH humana do subgrupo I "A" menos as CDR de Kabat (SEQ ID NOS:26, 27, 28, 29).
- esqueletos de consenso de VH humana do subgrupo 1 "B", "C" e "D" menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NOS:30, 31, 28, 29; SEQ ID NOS:30, 31, 32, 29; e SEQ ID NOS:30, 31, 33, 29).
- esqueleto de consenso de VH humana do subgrupo II "A" menos as CDR de Kabat (SEQ ID NOS:34, 35, 36, 29).
- esqueletos de consenso de VH humana do subgrupo II "B", "C" e "D" menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NOS:37, 38, 36, 29; SEQ ID NOS:37, 38, 39, 29; e SEQ ID NOS:37, 38, 40, 29).
- esqueleto de consenso de VH humana do subgrupo III "A" menos as CDR de Kabat (SEQ ID NOS:41, 42, 43, 29).
- esqueletos de consenso de VH humana do subgrupo III "B", "C" e "D" menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NOS:44, 45, 43, 29; SEQ ID NOS:44, 45, 46, 29; e SEQ ID NOS:44, 45, 46, 29).
- esqueleto de VH humana aceitador 1 "A" menos as CDR de Kabat (SEQ ID NOS:48, 42, 49, 29).
- esqueletos de VH humana aceitadores "B" e "C" menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NOS:44, 45, 49, 29; e SEQ ID NOS:44, 45, 50, 29).
- esqueleto de VH humana aceitadora 2 "A" menos as CDR de Kabat (SEQ ID NOS:48, 42, 51, 29).
- esqueleto de VH humana aceitador 2 "B," "C," e "D" menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NOS:44, 45, 51, 29; SEQ ID NOS:44, 45, 52, 29; e SEQ ID NOS:44, 45, 53, 29).

As **Figuras 4A e 4B** mostram sequências de esqueleto de consenso variáveis leves (VL) humanas aceitadoras exemplificativas para utilização na prática da presente invenção com identificadores de sequência como se segue:

- esqueleto de consenso de VL humana capa do subgrupo I-1 (v1-1): SEQ ID NOS:54, 55, 56, 57
- esqueleto de consenso de VL humana capa do subgrupo I (v1): SEQ ID NOS:54, 58, 56, 57
- esqueleto de consenso de VL humana capa do subgrupo II (v2): SEQ ID NOS:58, 59, 60, 57
- esqueleto de consenso de VL humana capa do subgrupo III (v3): SEQ ID NOS:61, 62, 63, 57
- esqueleto de consenso de VL humana capa do subgrupo IV (v4): SEQ ID NOS:64, 65, 66, 57.

A **Figura 5** representa alinhamentos de sequências da região Fc de IgG humana de sequência nativa, humIgG1 (alotípico não A, SEQ ID NO:85; e allotípico A, onde a sequência de aminoácidos SREEM no interior de SEQ ID NO:85 é alterada para SRDEL), humIgG2 (SEQ ID NO:86), humIgG3 (SEQ ID NO:87) e humIgG4 (SEQ ID NO:88) com diferenças entre as sequências marcadas com asteriscos. Os números em cima das sequências representam o sistema de numeração EU. É também mostrada uma região constante capa exemplificativa.

As **Figuras 6A–6D** representam uma análise FACS normalizada para o nível de exibição de cada anticorpo ou variante em fagos. A Figura 6A mostra os desvios de FACS em células que expressam STEAP-1 (LB50) para quatro anticorpos exemplificativos. A Figura 6B mostra os desvios de FACS em células que não expressam STEAP-1 (S408) para vários anticorpos como indicado na figura e no Exemplo 1. As Figuras 6C e 6D são alinhamentos de desvios de FACS após normalização para níveis de exibição em fagos.

As **Figuras 7A–7F** representam graficamente análises FACS que mostram a ligação de anticorpos anti-STEAP-1 murino, quimera e versão 24 humanizada a STEAP-1 humana expressa na superfície celular. As Figuras 7A–7C indicam que anti-STEAP-1 murino 120, quimera 120 e humanizado 120v.24 se ligam a STEAP-1 humana e de macaco *Cynomolgus*, mas não a STEAP-1 de ratinho. As Figuras 7D–

7F são gráficos de FACS que mostram a ligação de 120 murino, quimera 120 e humanizado 120v.24 (clone 67) a STEAP-1 humana expressa na superfície celular. A STEAP-1 exógena foi estavelmente expressa em células 293 (designadas células LB50) e em células PC3 (designadas células PS5.4) (Figuras 7D e 7E), e endogenamente expressa em células LNCaP BR (Figura 7F).

Figuras 8A e 8B. A **Figura 8A** é um gráfico que mostra que a administração de anti-STEAP-1 murino 120-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg foi eficaz num modelo de xenoenxerto de tumor da próstata (células LNCaP-Ner). Veja-se o Exemplo 4. A **Figura 8B** é um gráfico que mostra que a administração de uma única dose de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) e anti-STEAP-1 quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) se mostrou eficaz num modelo de tumor de xenoenxerto de células da próstata LNCaP. Veja-se o Exemplo 4.

A **Figura 9** é um gráfico que mostra que a administração de anticorpo anti-STEAP-1 quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (abreviado para anti-STEAP vcMMAE) a 3 mg/kg, ou anti-STEAP-1 quimera 120-MC-MMAF (abreviado para anti-STEAP mcMMAF) a 6 mg/kg, se mostrou eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige castrados transplantados com células LNCaP. Veja-se o Exemplo 4.

A **Figura 10** é um gráfico que mostra que a administração de anticorpo anti-STEAP-1 quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (abreviado para anti-STEAP vcMMAE (a 3 mg/kg) se mostrou eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID beige machos (dependente de androgénios) transplantados com células LuCap77. Veja-se o Exemplo 4.

A **Figura 11** é um gráfico que mostra que a administração de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg, anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-MMAF a 6 mg/kg e 12 mg/kg a ratinhos SCID-beige castrados transplantados com tumor da próstata LuCap35V se mostrou eficaz relativamente a controlos. Veja-se o Exemplo 4.

A **Figura 12** é um diagrama que representa STEAP-1 embebida numa membrana celular. A ligação de anticorpo 120 anti-STEAP-1

é dependente da conformação e não reconhece um epítopo linear de STEAP-1.

As **Figuras 13A-13D** mostram STEAP-1 expressa na superfície de células como detectada por imuno-histoquímica. A **Figura 13A** mostra uma coloração imuno-histoquímica de células 293 que expressam STEAP-1 exógena na superfície celular. A **Figura 13B** mostra uma coloração imuno-histoquímica de células PC3 que expressam STEAP-1 exógena na superfície celular. A **Figura 13C** mostra uma coloração imuno-histoquímica de células LNCaP que expressam STEAP-1 endógena na superfície celular. A **Figura 13D** mostra uma coloração imuno-histoquímica de células LuCaP77 que expressam STEAP-1 endógena na superfície celular.

As **Figuras 14A-14E** são gráficos que mostram a eficácia relativa de anticorpo anti-STEAP-1 120v.24-MCMMAF e anticorpo anti-STEAP-1 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE para matar células que expressam STEAP-1 *in vitro*. As células PS5.4 (**Figura 14A**) são células PC3 transformadas com um vector que codifica STEAP-1 de modo que a STEAP-1 é expressa na superfície celular. As células LB50 (**Figura 14B**) são células 293 transformadas com um vector que codifica STEAP-1 de modo que STEAP-1 é expressa na superfície celular. As células LNCaP (**Figura 14C**) expressam STEAP-1 endogenamente. "PC3 vec" (**Figura 14D**) e "293 vec" (**Figura 14E**) referem-se a células 293 e células PC3, respectivamente, transformadas com um vector de controlo.

A **Figura 15** mostra representações de conjugados de anticorpo e fármaco (ADC) anti-STEAP-1 manipulados com cisteína em que uma porção de fármaco está ligada a um grupo de cisteína manipulado em: a cadeia leve (LC-ADC); a cadeia pesada (HC-ADC); e a região Fc (Fc-ADC).

A **Figura 16** mostra os passos de: (i) redução de aductos de dissulfureto de cisteína e dissulfuretos intercadeias e intracadeias num anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína (TioMab) com o agente redutor TCEP (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina); (ii) oxidação parcial, *i.e.* reoxidação para reformar dissulfuretos intercadeias e intracadeias, com dhAA (ácido desidroascórbico); e (iii) conjugação do anticorpo reoxidado com um intermediário fármaco-ligante para formar um

conjugado de fármaco e anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína (ADC).

As **Figuras 17A-C** mostram os locais de substituições de aminoácidos feitas para gerar anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína (tio-mAb). A **Figura 17A** mostra a variante V205C de tio-LC com as correspondentes numeração sequencial e numeração normalizada de acordo com o sistema de Kabat. A **Figura 17B** mostra a variante A118C de tio-HC com as correspondentes numeração sequencial e numeração normalizada de acordo com o sistema EU. A **Figura 17C** mostra a variante S400C de tio-Fc com as correspondentes numeração sequencial e numeração normalizada de acordo com o sistema EU.

As **Figuras 18A-F** representam análises FACS que mostram que os conjugados de tio-anticorpo e fármaco (TDC) anti-STEAP-1 retêm a capacidade de se ligarem a STEAP-1 expressa na superfície celular. As **Figuras 18A-18C** são gráficos de FACS que mostram a ligação dos TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (abreviado para huSteap1 TDC (L205C) vcE e tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA 118C) (abreviado para huSteap1 TDC (HCA 118C) vcE) a STEAP-1 humana expressa na superfície celular. A STEAP-1 exógena foi expressa estavelmente em células 293 (designadas células LB50) e células PC3 (designadas células PS5.4) (**Figuras 18A e 18B**), e expressa endogenamente em células LNCaP BR (**Figura 18C**). As **Figuras 18D, 18E e 18F** são alinhamentos dos desvios de FACS apresentados nas Figuras **7A, 7B e 7C**, respectivamente.

As **Figuras 19A-C** mostram a eficácia relativa dos conjugados de tio-anticorpo e fármaco (TDC) anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (abreviado para huSteap1 TDC (L205C) vcE) e tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA 118C) (abreviado para huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) para matar células que expressam STEAP-1 *in vitro*. As células LB50 (**Figura 19A**) são células 293 transformadas com um vector que codifica STEAP-1 de modo que a STEAP-1 é expressa na superfície celular. As células PS5.4 (**Figura 19B**) são células PC3 transformadas com um vector que codifica STEAP-1 de modo que a STEAP-1 é expressa na superfície celular. As células LNCaP (**Figura 19C**) expressam STEAP-1 endogenamente.

A **Figura 20** é um gráfico que mostra que a administração de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA 118C) (abreviado para hu Steapl HC TDC vcE) a 3 mg/kg se mostrou eficaz relativamente a controlos num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige machos (dependente de androgénios) transplantados com células LNCaP. Veja-se o Exemplo 8.

A **Figura 21** é um gráfico que mostra que a administração de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado para hu Steapl HC TDC vcE) a 3 mg/kg, ou tio-humano 120-MC-MMAF (HCA118C) (abreviado para hu Steapl HC TDC mCF) a 1, 3 ou 6 mg/kg, se mostrou eficaz relativamente a controlos num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige machos (dependente de androgénios) transplantados com células LNCaP. Veja-se o Exemplo 8.

A **Figura 22** é um gráfico que mostra que a administração de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado para hu Steapl HC TDC vcE) a 3 mg/kg, ou tio-humano 120-MC-MMAF (HCA125C) (abreviado para hu Steapl HC TDC mCF) a 3 ou 6 mg/kg, se mostrou eficaz relativamente a controlos num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige castrados transplantados com tumor da próstata LuCaP 35V. Veja-se o Exemplo 8.

A **Figura 23** mostra os locais de substituições de aminoácidos feitas para gerar o anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína (tio-mAb) designado "Simmons IV" ou simplesmente "SGIV." A sequência de aminoácidos da cadeia leve de SGIV (SEQ ID NO:90) está apresentada em alinhamento com a cadeia leve de anticorpo mu 120 (SEQ ID NO:5) e anticorpo 120.v24 (SEQ ID NO:91). A variante tio-LC de SGIV com as correspondentes numeração sequencial e numeração normalizada de acordo com o sistema de Kabat está apresentada alinhada com o anticorpo progenitor mu 120 assim como a variante tio-LC de 120.v24 com as correspondentes numeração sequencial e numeração normalizada de acordo com o sistema de Kabat. As CDR estão em caixas (CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3). As sequências que abraçam as CDR são as sequências de esqueleto (FR-L1 a FR-L4). As sequências estão numeradas de acordo com a numeração de Kabat.

As CDR de Kabat, de Chothia e de contacto estão indicadas próximo das CDR em caixas. Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 24** mostra os locais de substituições de aminoácidos no esqueleto feitas para gerar várias variantes de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína (tio-mAb) dos anticorpos SGIV e 120v.24. A sequência de aminoácidos da cadeia leve de SGIV está apresentada com a numeração normalizada de acordo com o sistema de Kabat, em alinhamento com variantes LS.VLVH1 (SEQ ID NO:92); LS.VLVH2 (SEQ ID NO:93); LS.Q (SEQ ID NO:94); e LS.CH1 (SEQ ID NO:95). A sequência de aminoácidos da cadeia leve de 120.v24 com numeração normalizada de acordo com o sistema de Kabat está mostrada em alinhamento com variantes ED.FW1 (SEQ ID NO:96); ED.FW2 (SEQ ID NO:97); ED.FW3 (SEQ ID NO:98); ED.all (SEQ ID NO:99); ED.Pro (SEQ ID NO:100); e ED.pl (SEQ ID NO:101). As CDR estão em caixas. As sequências estão numeradas de acordo com a numeração de Kabat. Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 25** mostra gráficos Scatchard de ligação do anticorpo a STEAP-1 expressa na superfície de células LNCaP.BR. As amostras foram medidas em duplicado utilizando o anticorpo 120.v24 (Figuras 25(A)-(D)) e a variante SGIV (Figuras 25(E)-(H)). Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 26** mostra gráficos Scatchard de ligação do anticorpo a STEAP-1 expressa na superfície de células 293.LB50. As amostras foram medidas em duplicado utilizando o anticorpo 120.v24 (Figuras 26(A)-(D)) e a variante de SGIV (Figuras 26(E)-(H)). Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 27** é uma tabela que compara as afinidades médias de ligação, como medido por análise Scatchard, para os anticorpos mu 1789, mu 120, Fc quimera, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 e tio-SGIV em células PC-3-PS5.4, 293-LB50 e LNCaP-BR, assim como em células 293 que expressam transientemente STEAP-1. Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 28** representa uma análise FACS que mostra os desvios de FACS em células estavelmente transfectadas com STEAP-1 (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 e 293 STEAP-LB53) com amostras de anticorpo SGIV e 120.v24. Veja-se o Exemplo 9.

A **Figura 29** mostra o título de anticorpo observado em diferentes colheitas de células que produzem anticorpo SGIV ou 120.v24.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DE CONCRETIZAÇÕES DA INVENÇÃO

São proporcionados anticorpos como definido nas reivindicações 11 e 13 que se ligam a STEAP-1. São adicionalmente proporcionados conjugados como definido nas reivindicações 7, 12, 13 e 14 compreendendo anticorpos anti-STEAP-1. Os anticorpos e imunoconjungados da invenção são úteis, e.g., para o diagnóstico ou tratamento de desordens associadas à expressão alterada, e.g., expressão aumentada, de STEAP-1. Os anticorpos ou os imunoconjungados da invenção podem ser úteis para o diagnóstico ou tratamento de uma desordem proliferativa celular, tal como um tumor ou um cancro. Em determinadas concretizações, a STEAP-1 é expressa em tecido tumoral ou de cancro da próstata, do pulmão ou do cólon. Em determinadas concretizações, os anticorpos ou os imunoconjungados da invenção são úteis para a detecção de STEAP-1, e.g., STEAP-1 expressa na superfície celular. Em determinadas concretizações, os anticorpos ou os imunoconjungados da invenção são úteis para a detecção de expressão de STEAP-1 na superfície de células normais e/ou tumorais ou cancerosas de tecido da próstata, do pulmão ou do cólon.

São proporcionados polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1. São proporcionados vectores compreendendo polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1, e células hospedeiras compreendendo esses vectores. São também proporcionadas composições, incluindo formulações farmacêuticas, compreendendo qualquer um ou mais dos polinucleótidos, anticorpos anti-STEAP-1 ou imunoconjungados da invenção.

Métodos de tratamento de uma desordem proliferativa celular, incluindo, mas não se lhes limitando, tumor ou cancro, com um anticorpo, um conjugado de fármaco e anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1, são proporcionados pela presente divulgação. Esses métodos incluem, mas não se lhes limitam, o tratamento de um tumor ou cancro na próstata, no pulmão ou no cólon de um mamífero. Métodos de detecção de expressão de

STEAP-1 numa célula de tecido utilizando um anticorpo, um conjugado de fármaco e anticorpo ou um imunoconjuguado anti-STEAP-1, são proporcionados pela presente divulgação. Esses métodos incluem, mas não se lhes limitam, detecção de expressão de STEAP-1 sobre, a título de exemplo não limitante, uma célula normal, uma célula tumoral ou uma célula de cancro da próstata, do pulmão ou do cólon.

Técnicas Gerais

As técnicas e procedimentos aqui descritos ou referenciados são genericamente bem entendidos e vulgarmente empregues utilizando metodologia convencional por peritos na especialidade, tais como, por exemplo, as amplamente utilizadas metodologias descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); a série *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Pcr 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames e G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather e P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Proceedings* (A. Doyle, J.B. Griffiths, e D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammal Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway e P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd e C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow e D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti e J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995);

e *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Definições

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de uma componente do seu ambiente natural. As componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com as utilizações em investigação, diagnóstico ou terapêutico para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em algumas concretizações, um anticorpo é purificado (1) até mais de 95% em peso do anticorpo como determinado por, por exemplo, o método de Lowry, e em algumas concretizações, até mais de 99% em peso; (2) num grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna por utilização de, por exemplo, um sequenciador de taça rotativa, ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando, por exemplo, coloração com azul de Coomassie ou com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* no interior de células recombinantes pois pelo menos uma componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Vulgarmente, contudo, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é separada de pelo menos uma outra molécula de ácido nucleico com que está vulgarmente associada, por exemplo, no seu ambiente natural. Uma molécula de ácido nucleico isolada inclui adicionalmente uma molécula de ácido nucleico contida em células que vulgarmente expressam a molécula de ácido nucleico, mas a molécula de ácido nucleico está presente extracromossomicamente ou numa localização cromossómica que é diferente da sua localização cromossómica natural.

"Purificado" significa que uma molécula está presente numa amostra numa concentração de pelo menos 95% em peso, ou pelo menos 98% em peso da amostra em que está contida.

A expressão "substancialmente similar" ou "substancialmente igual", como aqui se utiliza, denotam um grau

suficientemente elevado de similaridade entre dois valores numéricos (por exemplo, um associado a um anticorpo da invenção e o outro associado a um anticorpo de referência/ comparador), de modo que um perito na especialidade considere a diferença entre os dois valores de pouco ou nenhum significado biológico e/ou estatístico no contexto da característica biológica medida pelos referidos valores (e.g., valores de Kd). A diferença entre os referidos dois valores é, por exemplo, inferior a cerca de 50%, inferior a cerca de 40%, inferior a cerca de 30%, inferior a cerca de 20% e/ou inferior a cerca de 10% em função do valor de referência/comparador.

As frases "substancialmente reduzido" ou "substancialmente diferente", como aqui se utilizam, denotam um grau suficientemente elevado de diferença entre dois valores numéricos (geralmente um associado a uma molécula e o outro associado a uma molécula de referência/comparadora) de modo que um perito na especialidade considere a diferença entre os dois valores estatisticamente significativa no contexto da característica biológica medida pelos referidos valores (e.g., valores de Kd). A diferença entre os referidos dois é, por exemplo, superior a cerca de 10%, superior a cerca de 20%, superior a cerca de 30%, superior a cerca de 40% e/ou superior a cerca de 50% em função do valor para a molécula de referência/comparadora.

Com o termo "vector", como aqui se utiliza, pretende-se referir uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a um ADN circular de cadeia dupla no qual podem ser ligados segmentos de ADN adicionais. Outro tipo de vector é um vector fágico. Outro tipo de vector é um vector viral, em que segmentos de ADN adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Determinados vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (e.g., vectores bacterianos possuindo uma origem de replicação bacteriana e vectores epissómicos de mamífero). Outros vectores (e.g., vectores não epissómicos de mamífero) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira por introdução na célula hospedeira, e são desse modo replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Adicionalmente, determinados vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão

operativamente ligados. Estes vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinantes" ou simplesmente, "vectores de expressão". Em geral, os vectores de expressão com utilidade em técnicas de ADN recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" podem ser utilizados indiferentemente pois o plasmídeo é a forma mais vulgarmente utilizada de vector.

"Polinucleótido" ou "ácido nucleico", como aqui se utilizam indiferentemente, referem-se a polímeros de nucleótidos de qualquer comprimento, e incluem ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos ou bases modificados e/ou seus análogos, ou qualquer substrato que possa ser incorporado num polímero por ADN- ou ARN-polimerase ou por uma reacção sintética. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e seus análogos. Se presente, a modificação na estrutura do nucleótido pode ser conferida antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não nucleotídicos. Um polinucleótido pode compreender uma modificação(s) feita após a síntese, tal como conjugação com um marcador. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "remates", substituição de um ou mais dos nucleótidos de ocorrência natural por um análogo, modificações internucleótidos tais como, por exemplo, com ligações não carregadas (e.g., fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (e.g., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), contendo porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (e.g., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinal, pty-L-lisina, etc.), com intercaladores (e.g., acridina, psoraleno, etc.), contendo quelantes (e.g., metais, metais radioactivos, boro, metais oxidantes, etc.), contendo alquilantes, com ligações modificadas (e.g., ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), assim como formas não modificadas do(s) polinucleótidos(s). Adicionalmente, qualquer dos grupos hidroxilo vulgarmente presentes nos açúcares pode ser substituído, por exemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protectores padrão, ou activado para preparar ligações adicionais a nucleótidos adicionais, ou pode ser conjugado a suportes sólidos ou semi-sólidos. O OH terminal a 5' e a 3' pode ser fosforilado ou substituído por aminas ou

porções de grupos de remate orgânicos de 1 a 20 átomos de carbono. Outros hidroxilos podem também ser derivatizados com grupos protectores padrão. Os polinucleótidos podem também conter formas análogas de açúcares de ribose ou desoxirribose que são geralmente conhecidas na especialidade, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcares carbocíclicos, açúcares anoméricos, açúcares epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares de piranose, açúcares de furanose, sedo-heptuloses, análogos acíclicos, e análogos de nucleósidos básicos tais como metilribósido. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos ligantes alternativos. Estes grupos ligantes alternativos incluem, mas não se lhes limitam, concretizações em que fosfato é substituído por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquilo (1-20 C) substituído ou não substituído, opcionalmente contendo uma ligação éter (-O-), arilo, alcenilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou aralquilo. Nem todas as ligações num polinucleótido precisam de ser idênticas. A descrição precedente aplica-se a todos os polinucleótidos aqui referidos, incluindo ARN e ADN.

"Oligonucleótido", como aqui se utiliza, refere-se genericamente a polinucleótidos curtos, geralmente de cadeia simples, geralmente sintéticos, que são geralmente, mas não necessariamente, inferiores a cerca de 200 nucleótidos de comprimento. Os termos "oligonucleótido" e "polinucleótido" não são mutuamente exclusivos. A descrição acima para os polinucleótidos é igualmente e inteiramente aplicável a oligonucleótidos.

"Percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" em relação a uma sequência polipeptídica de referência é definida como a percentagem de resíduos de aminoácido numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência polipeptídica de referência, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para se conseguir a percentagem máxima de identidade de sequências, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequências. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequências de

aminoácidos pode ser conseguida de várias maneiras que fazem parte dos conhecimentos dos peritos na especialidade, por exemplo, utilizando software de computador disponível ao público tal como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para o alinhamento das sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para se conseguir o alinhamento máximo ao longo do comprimento completo das sequências em comparação. Para os presentes fins, contudo, os valores da % de identidade de sequências de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2. O programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria da Genentech, Inc., e o código-fonte foi apresentado com documentação para o utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado com o número de registo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível ao público a partir da Genentech, Inc., South San Francisco, California, ou pode ser compilado a partir do código-fonte. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, preferivelmente UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que o ALIGN-2 é empregue para comparações de sequência de aminoácidos, a % de identidade de sequências de aminoácidos de uma determinada sequência de aminoácidos A relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B (o que pode alternativamente ser refraseado como uma determinada sequência de aminoácidos A que possui ou comprehende uma determinada % de identidade de sequências de aminoácidos relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fracção X/Y}$$

onde X é o número de resíduos de aminoácido pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácido em B. Notar-se-á que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de

identidade de sequências de aminoácidos de A relativamente a B não será igual à % de identidade de sequências de aminoácidos de B relativamente a A. A menos que especificamente indicado em contrário, todos os valores e % de identidade de sequências de aminoácidos aqui utilizados são obtidos como descrito no parágrafo imediatamente anterior utilizando o programa de computador ALIGN-2.

O termo "STEAP-1", como aqui se utiliza, refere-se a qualquer STEAP-1 nativa de qualquer fonte de vertebrado, incluindo mamíferos tais como primatas (e.g. seres humanos, macaco *Cynomolgus* (cyno)) e roedores (e.g., ratinhos e ratos), a menos que indicado em contrário. O termo abrange STEAP-1 de "comprimento completo", não processada, assim como qualquer forma de STEAP-1 que resulte de processamento na célula. O termo também abrange variantes de ocorrência natural de STEAP-1, e.g., variantes de *splicing*, variantes alélicas e isoformas. A sequência de aminoácidos de STEAP-1 humana está representada na Figura 1 (SEQ ID NO:1). Numa concretização, a STEAP-1 é expressa na superfície celular, tal como na superfície de uma célula normal da próstata, do pulmão ou do cólon, e tem expressão aumentada em células cancerosas da próstata, do pulmão ou do cólon ou metástases destas células cancerosas. A Figura 1 também representa a sequência de aminoácidos de STEAP-1 de ratinho e de macaco *Cynomolgus* (SEQ ID NOS:2 e 3, respectivamente).

"Anticorpos" (Ab) e "imunoglobulinas" (Ig) são glicoproteínas possuindo características estruturais similares. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação para com um抗原 específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos que geralmente não têm especificidade para com um抗原. Os polipeptídos deste último tipo são, por exemplo, produzidos em níveis baixos pelo sistema linfático e em níveis aumentados por mielomas.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são utilizados indiferentemente no sentido mais lato e incluem anticorpos monoclonais (e.g., anticorpos monoclonais de comprimento completo ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos monovalentes, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos desde que

exibam a actividade biológica desejada) e podem também incluir determinados fragmentos de anticorpo (como aqui descrito com maior detalhe). Um anticorpo pode ser quimérico, humano, humanizado e/ou maturado em afinidade.

As expressões "anticorpo anti-STEAP-1" ou "um anticorpo que se liga a STEAP-1" referem-se a um anticorpo que é capaz de se ligar a STEAP-1 com suficiente afinidade para que o anticorpo seja útil como agente de diagnóstico e/ou terapêutico no direcccionamento para STEAP-1. Preferivelmente, a extensão de ligação de um anticorpo anti-STEAP-1 a uma proteína que não STEAP-1 não relacionada é inferior a cerca de 10% da ligação do anticorpo a STEAP-1 como medida, e.g., por um radioimunoensaio (RIA). Em determinadas concretizações, um anticorpo que se liga a STEAP-1 possui uma constante de dissociação (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ ou $\leq 0,1 \text{ nM}$. Em determinadas concretizações, um anticorpo anti-STEAP-1 liga-se a um epítopo de STEAP-1 que é conservado entre as STEAP-1 de diferentes espécies.

A "região variável" ou o "domínio variável" de um anticorpo referem-se aos domínios amino-terminais da cadeia pesada ou leve do anticorpo. O domínio variável da cadeia pesada pode ser referido como "VH". O domínio variável da cadeia leve pode ser referido como "VL". Estes domínios são geralmente as partes mais variáveis de um anticorpo e contêm os locais de ligação ao抗原.

O termo "variável" refere-se ao facto de que determinadas porções dos domínios variáveis diferem extensamente em sequência entre anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular pelo seu抗原 particular. Contudo, a variabilidade não está homogeneamente distribuída por todos os domínios variáveis dos anticorpos. Está concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis (HVR) tanto nos domínios variáveis da cadeia leve como de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas as regiões de esqueleto (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas compreendem cada um quatro regiões FR, adoptando largamente uma configuração em folha beta, ligadas por três

CDR, que formam voltas que ligam, e em alguns casos fazem parte de, a estrutura da folha beta. As CDR em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao抗原 dos anticorpos (veja-se Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos directamente na ligação de um anticorpo a um抗原, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados capa () e lambda (), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo das sequências de aminoácidos dos domínios constantes das suas cadeias pesadas, os anticorpos (imunoglobulinas) podem ser atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados , , , e μ , respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas e estão descritas genericamente em, por exemplo, Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (2000). Um anticorpo pode fazer parte de uma molécula de fusão maior, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou péptidos.

As expressões "anticorpo de comprimento completo", "anticorpo intacto" e "anticorpo completo" são aqui utilizadas indiferentemente para referir um anticorpo na sua forma substancialmente intacta, e não fragmentos de anticorpo como definido adiante. As expressões referem-se particularmente a um anticorpo com cadeias pesadas que contêm a região Fc.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção retém pelo menos uma, e tantas como a maioria ou a totalidade, das funções normalmente associadas a essa porção quando presente num anticorpo intacto. Numa concretização, um fragmento de anticorpo comprehende um local de ligação ao antigénio do anticorpo intacto e assim retém a capacidade de se ligar ao antigénio. Em outra concretização, um fragmento de anticorpo, por exemplo um que comprehenda a região Fc, retém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas à região Fc quando presente num anticorpo intacto, tais como ligação a FcRn, a modulação da semivida do anticorpo, a função de ADCC e a ligação do complemento. Numa concretização, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que possui uma semivida *in vivo* substancialmente similar a um anticorpo intacto. Por exemplo, um tal fragmento de anticorpo pode compreender um braço de ligação ao antigénio ligado a uma sequência de Fc capaz de conferir *in vivo* estabilidade ao fragmento.

A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antigénio idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antigénio, e um fragmento residual "Fc", cujo nome reflecte a sua capacidade para cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina origina um fragmento F(ab')₂ que possui dois locais de combinação com antigénio e é ainda capaz de ligar cruzadamente o antigénio.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de ligação ao antigénio completo. Numa concretização, uma espécie de Fv de duas cadeias consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação não covalente forte. Numa espécie de Fv de cadeia única (scFv), um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem estar covalentemente ligados por um ligante peptídico flexível de modo que as cadeias, leve e pesada, possam associar-se numa estrutura "dimérica" análoga à das espécies de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interactuam para definir um local de ligação ao antigénio na superfície do dímero VH-VL. Colectivamente, as seis CDR conferem ao anticorpo especificidade de ligação para com o antigénio. Contudo, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para

um抗原) tem a capacidade de reconhecer e ligar-se ao antígeno, embora com uma menor afinidade do que o local de ligação completo.

O fragmento Fab contém os domínios variáveis das cadeias pesada e leve e também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio da cadeia pesada CH1 incluindo uma ou mais cisteínas da região de charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo F(ab')₂ originalmente eram produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de charneira entre si. São também conhecidos outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo.

Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios VH e VL do anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo scFv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite que o scFv forme a estrutura desejada para a ligação ao antígeno. Para uma revisão sobre scFv veja-se Pluckthun, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos pequenos de anticorpos com dois locais de ligação ao antígeno, fragmentos estes que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Utilizando um ligante que seja demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao antígeno. Os diacorpos podem ser bivalentes ou biespecíficos. Os diacorpos estão descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404,097; WO93/1161; Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; e Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). "Triacorpos" e "tetracorpos" estão também descritos em Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

A expressão "anticorpo monoclonal" como aqui se utiliza refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações, e.g., mutações de ocorrência natural, que possam estar presentes em quantidades mínimas. Assim, o adjetivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos. Em determinadas concretizações, este anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo compreendendo uma sequência polipeptídica que se liga a um alvo, em que a sequência polipeptídica de ligação ao alvo foi obtida por um processo que inclui a selecção de uma única sequência polipeptídica de ligação ao alvo a partir de uma pluralidade de sequências polipeptídicas. Por exemplo, o processo de selecção pode ser a selecção de um clone único a partir de uma pluralidade de clones, tal como um conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos ou clones de ADN recombinante. Deve entender-se que uma sequência de ligação ao alvo seleccionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para melhorar a afinidade para com o alvo, para humanizar a sequência de ligação ao alvo, para melhorar a sua produção na cultura celular, para reduzir a sua imunogenicidade *in vivo*, para criar um anticorpo multiespecífico, etc., e que um anticorpo compreendendo a sequência de ligação ao alvo alterada é também um anticorpo monoclonal da presente invenção. Em contraste com preparações de anticorpos policlonais que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpos monoclonais é dirigido contra um único determinante num抗ígenio. Em adição à sua especificidade, as preparações de anticorpos monoclonais são vantajosas na medida em que tipicamente não estão contaminadas por outras imunoglobulinas.

O adjetivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogénea de anticorpos, e não deve ser entendido como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a utilizar de acordo com a presente invenção podem ser preparados através de uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método do hibridoma (e.g., Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975);

Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (veja-se, e.g., a Patente U.S. 4,816,567), tecnologias de exibição em fagos (veja-se, e.g., Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); e Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), e tecnologias para a produção de anticorpos humanos ou semelhantes a humanos em animais que têm partes ou a totalidade dos loci da imunoglobulina humana ou genes que codificam sequências de imunoglobulina humana (veja-se, e.g., WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes U.S. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., *Bio.Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse particular de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse e anticorpos, assim como fragmentos destes anticorpos, desde que exibam a actividade biológica desejada (Patente U.S. 4,816,567; e Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (e.g., murinos) são anticorpos quiméricos que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Numa concretização, um anticorpo humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo recebedor) em que resíduos de uma região

hipervariável do recebedor estão substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como de ratinho, rato, coelho ou primata não humano, possuindo a especificidade, afinidade e/ou capacidades desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de esqueleto (FR) da imunoglobulina humana estão substituídos por resíduos correspondentes não humanos. Adicionalmente, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se encontram no anticorpo recebedor nem no anticorpo dador. Estas modificações podem ser feitas para adicionalmente refinar o desempenho do anticorpo. Em geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as voltas hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana, e todas ou substancialmente todas as FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja-se Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Vejam-se também os seguintes artigos de revisão e referências aí citadas: Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Um "anticorpo humano" é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou foi preparado utilizando qualquer das técnicas para a produção de anticorpos humanos como aqui divulgado. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao抗原 não humanos.

As expressões "região hipervariável", "HVR" ou "HV", quando aqui utilizadas referem-se a regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis em sequência e/ou formam voltas estruturalmente definidas. Geralmente, os anticorpos compreendem seis regiões hipervariáveis; três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3). Em anticorpos nativos, H3 e L3 exibem a maior diversidade das seis regiões hipervariáveis, e

H3 em particular crê-se desempenhar um papel único ao conferir especificidade fina aos anticorpos. Xu et al. (2000) *Immunity* 13:37-45; Johnson e Wu (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De facto, anticorpos camelídeos de ocorrência natural consistindo apenas numa cadeia pesada são funcionais e estáveis na ausência de cadeia leve. Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff et al. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736.

Estão em utilização e estão aqui abrangidas várias delinearções de regiões hipervariáveis. As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR) de Kabat são baseadas na variabilidade de sequências e são muito vulgarmente utilizadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refere-se em vez disso à localização das voltas estruturais (Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As regiões hipervariáveis de AbM representam um compromisso entre as CDR de Kabat e as voltas estruturais de Chothia, e são utilizadas pelo software de modelação de AbM da Oxford Molecular. As regiões hipervariáveis de "contacto" são baseadas numa análise das estruturas cristalinas complexas disponíveis. Os resíduos de cada uma destas regiões hipervariáveis estão apresentados adiante.

Volta	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeração de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeração de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

As regiões hipervariáveis podem compreender "regiões hipervariáveis prolongadas" como se segue: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 ou 89-96 (L3) na VL e 26-35 ou 26-35A (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 ou 95-102 (H3) na VH. Os resíduos do domínio variável estão numerados de acordo com Kabat et al., supra, para cada uma destas definições. As

regiões hipervariáveis HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3 dos anticorpos anti-STEAP-1 humanizados 120v.24 da invenção são H26-H35A, H49-H6 e H95-H102 utilizando a numeração de Kabat. As regiões hipervariáveis HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3 dos anticorpos anti-STEP-1 humanizados 120v.24 da invenção são L24-34, L50-56 e L89-97 utilizando a numeração de Kabat. Como aqui se utilizam, os termos "HVR" e "CDR" são utilizados indiferentemente.

Os resíduos de "esqueleto" ("framework") ou "FR" são os resíduos do domínio variável que não os resíduos da região hipervariável como aqui definido.

As expressões "numeração de resíduos do domínio variável como em Kabat" ou "numeração das posições de aminoácidos como em Kabat", e as suas variações, referem-se ao sistema de numeração utilizado para domínios variáveis de cadeias pesadas ou domínios variáveis de cadeias leves da compilação de anticorpos em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Utilizando este sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais correspondentes a um encurtamento, ou uma inserção, numa FR ou HVR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir uma inserção de um único aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (e.g. resíduos 82a, 82b e 82c, etc. de acordo com Kabat) após o resíduo 82 da FR da cadeia pesada. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um determinado anticorpo por alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência "padrão" numerada de Kabat.

Um anticorpo "maturado em afinidade" é um que possui uma ou mais alterações numa ou mais das suas HVR que resulta numa melhoria da afinidade do anticorpo para com o antigénio, comparativamente com um anticorpo progenitor que não possui essa(s) alteração(ões). Numa concretização, um anticorpo maturado em afinidade possui afinidades na gama nanomolar ou mesmo picomolar para com o antigénio alvo. Os anticorpos maturados em afinidade são produzidos por procedimentos conhecidos na especialidade. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) descrevem a maturação de afinidade por

baralhamento ("shuffling") de domínios VH e VL. A mutagénese aleatória de resíduos de HVR e/ou de esqueleto está descrita por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Um anticorpo "bloqueante" ou um anticorpo "antagonista" é um que inibe ou reduz a actividade biológica do抗igénio a que se liga. Determinados anticorpos bloqueantes ou anticorpos antagonistas inibem substancialmente ou completamente a actividade biológica do抗igénio.

Um "anticorpo agonista", como aqui se utiliza, é um anticorpo que imita pelo menos uma das actividades funcionais de um polipéptido de interesse.

"Funções efectoras" do anticorpo referem-se às actividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de sequência de aminoácidos variante) de um anticorpo, e variam com o isotipo do anticorpo. Os exemplos de funções efectoras de anticorpos incluem: ligação a Clq e citotoxicidade dependente do complemento; ligação a receptores de Fc; citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; infra-regulação de receptores da superfície celular (e.g. receptor de células B); e activação de células B.

"Receptor de Fc" ou "FcR" descrevem um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. Em algumas concretizações, um FcR é um FcR humano nativo. Em algumas concretizações, um FcR é um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses Fc RI, Fc RII e Fc RIII, incluindo variantes alélicas e formas originárias de splicing alternativo destes receptores. Os receptores Fc RII incluem Fc RIIA (um "receptor activador") e Fc RIIB (um "receptor inibidor"), que possuem sequências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor activador Fc RIIA contém um motivo de activação à base de tirosinas imunorreceptor (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor inibidor Fc RIIB contém um motivo de inibição à base de tirosinas imunorreceptor (ITIM) no seu domínio

citoplasmático. (veja-se Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Os FcR estão revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Outros FcR, incluindo os que serão identificados no futuro, estão aqui abrangidos no termo "FcR".

A expressão "receptor de Fc" ou "FcR" também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) e pela regulação da homeostasia de imunoglobulinas. São conhecidos métodos de medição da ligação a FcRn (veja-se, e.g., Ghetie 1997, Hinton 2004). A ligação a FcRn humano *in vivo* e a semivida sérica de polipeptídos de ligação de elevada afinidade a FcRn humano podem ser ensaiadas, e.g., em ratinhos transgénicos ou em linhas celulares humanas transfetadas que expressam FcRn humano, ou em primatas administrados com os polipeptídos variantes de Fc.

Em WO00/42072 (Presta) descrevem-se variantes de anticorpos com ligação melhorada ou diminuída aos FcR. Veja-se, também, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

As "células efectoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcR e desempenham funções efectoras. Em determinadas concretizações, as células expressam pelo menos Fc RIII e desempenham a(s) função(ões) efectoras de ADCC. Os exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos. As células efectoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa, e.g., do sangue.

"Citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos" ou "ADCC" refere-se a uma forma de citotoxicidade em que Ig segregada ligada em receptores de Fc (FcR) presentes em certas células citotóxicas (e.g. células assassinas naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo portadora do抗igénio e subsequentemente matem a célula alvo com citotoxinas. As principais células para mediação de ADCC, as células NK, expressam apenas Fc RIII, enquanto os

monócitos expressam Fc RI, Fc RII e Fc RIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para avaliar a actividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode-se realizar um ensaio da ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente US 5,500,362 ou 5,821,337 ou Presta Patente U.S. 6,737,056. As células efectoras úteis para estes ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células assassinas naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a actividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, e.g., num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença de complemento. A activação da via clássica do complemento é iniciada pela ligação da primeira componente do sistema do complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse apropriada) que estão ligados ao seu antigénio cognato. Para determinar a activação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, e.g. como descrito em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Variantes polipeptídicas com as sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e capacidade de ligação a C1q aumentada ou diminuída estão descritas na Patente US 6,194,551B1 e WO99/51642. O conteúdo destas publicações de patentes são aqui especificamente incorporados por referência. Veja-se, também, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

A expressão "polipéptido compreendendo uma região Fc" refere-se a um polipéptido, tal como um anticorpo ou uma imunoadesina, que compreende uma região Fc. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a purificação do polipéptido ou por engenharia recombinante do ácido nucleico que codifica o polipéptido. Desse modo, uma composição compreendendo um polipéptido possuindo uma região Fc de acordo com a presente invenção pode compreender polipéptidos com K447, com todas as K447 removidas, ou uma mistura de polipéptidos com e sem o resíduo K447.

Um "esqueleto humano aceitador" para os presentes fins é um esqueleto compreendendo a sequência de aminoácidos de um esqueleto de VL ou VH derivado de um esqueleto de imunoglobulina humana ou um esqueleto de consenso humano. Um esqueleto humano aceitador "derivado de" um esqueleto de imunoglobulina humana ou um esqueleto de consenso humano pode compreender a sua mesma sequência de aminoácidos, ou pode conter alterações preexistentes na sequência de aminoácidos. Em algumas concretizações, o número de alterações preexistentes de aminoácidos é 10 ou menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, 6 ou menos, 5 ou menos, 4 ou menos, 3 ou menos, ou 2 ou menos. Quando estão presentes alterações preexistentes de aminoácidos numa VH, preferivelmente essas alterações ocorrem em apenas três, duas ou uma das posições 71H, 73H e 78H; por exemplo, os resíduos de aminoácido nessas posições podem ser 71A, 73T e/ou 78A. Numa concretização, o esqueleto humano de VL aceitador é idêntico em sequência à sequência de esqueleto de VL de imunoglobulina humana ou à sequência de esqueleto de consenso humano.

Um "esqueleto de consenso humano" é um esqueleto que representa os resíduos de aminoácido de ocorrência mais comum numa selecção de sequências de esqueleto de VL ou VH de imunoglobulina humana. Geralmente, a selecção de sequências de VL ou VH de imunoglobulina humana é de um subgrupo de sequências do domínio variável. Geralmente, o subgrupo de sequências é um subgrupo como em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Numa concretização, para a VL, o subgrupo é o subgrupo capa I como em Kabat *et al.*, *supra*. Numa concretização, para a VH, o subgrupo é o subgrupo III como em Kabat *et al.*, *supra*.

Um "esqueleto de consenso de VH do subgrupo III" compreende a sequência de consenso obtida das sequências de aminoácidos no subgrupo III variável pesado de Kabat *et al.*, *supra*. Numa concretização, a sequência de aminoácidos de esqueleto de consenso de VH do subgrupo III compreende pelo menos uma porção ou a totalidade de cada uma das seguintes sequências:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEQ ID NO:21)-HVR-H1-
WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEQ ID NO:22)-HVR-H2-

RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, SEQ ID NO:23)-HVR-H3-WGQGTI.VTVSS (FR-H4, SEQ ID NO:24).

Um "esqueleto de consenso de VL do subgrupo I" compreende a sequência de consenso obtida das sequências de aminoácidos no subgrupo I capa leve variável de Kabat *et al.*, *supra*. Numa concretização, as sequências de aminoácidos de esqueleto de consenso de VH do subgrupo I compreendem pelo menos uma porção ou a totalidade de cada uma das seguintes sequências:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, SEQ ID NO:17)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, SEQ ID NO:18)-HVR-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, SEQ ID NO:19)-HVR-L3-FGQGTKVEIKR (FR-L4, SEQ ID NO:20) .

"Sequência de sinal de secreção" ou "sequência de sinal" referem-se a uma sequência de ácido nucleico que codifica um péptido de sinal curto que pode ser utilizado para dirigir uma proteína de interesse sintetizada de novo através da membrana celular, usualmente a membrana interna ou ambas as membranas interna e externa de procariotas. Como tal, a proteína de interesse tal como o polipéptido da cadeia leve ou pesada de imunoglobulina é segregado para o periplasma das células hospedeiras procariotas ou para o meio de cultura. O péptido de sinal codificado pela sequência de sinal de secreção pode ser endógeno à célula hospedeira, ou pode ser exógeno, incluindo péptidos de sinal nativos ao polipéptido a expressar. As sequências de sinal de secreção estão tipicamente presentes no terminal amino de um polipéptido a expressar, e são tipicamente removidas enzimaticamente entre a biossíntese e a secreção do polipéptido a partir do citoplasma. Assim, o péptido de sinal usualmente não está presente num produto de proteína madura.

Um "aminoácido de cisteína livre" refere-se a um resíduo de aminoácido de cisteína que foi manipulado num anticorpo progenitor, possui um grupo tiol funcional (-SH), e não está emparelhado, nem de outro modo faz parte de uma ponte dissulfureto intramolecular ou intermolecular.

A expressão "valor de reactividade de tiol" é uma caracterização quantitativa da reactividade de aminoácidos de cisteína livres. O valor de reactividade de tiol é a percentagem de um aminoácido de cisteína livre num anticorpo manipulado com

cisteína que reage com um reagente reactivo com tiol, e convertida num valor máximo de 1. Por exemplo, um aminoácido de cisteína livre num anticorpo manipulado com cisteína que reage com 100% de rendimento com um reagente reactivo com tiol, tal como um reagente de biotina-maleimida, para formar um anticorpo marcado com biotina possui um valor de reactividade de tiol de 1,0. Outro aminoácido de cisteína manipulado no mesmo anticorpo progenitor ou num diferente, que reage com 80% de rendimento com um reagente reactivo com tiol possui um valor de reactividade de tiol de 0,8. Outro aminoácido de cisteína manipulado no mesmo anticorpo progenitor, ou num diferente, que não reage de todo com um reagente reactivo com tiol possui um valor de reactividade de tiol de 0. A determinação do valor de reactividade de tiol de uma cisteína particular pode ser conduzida por ensaio ELISA, espectroscopia de massa, cromatografia líquida, autorradiografia, ou outros testes analíticos quantitativos. Os reagentes reactivos com tiol que permitem a captura do anticorpo manipulado com cisteína e a comparação e a quantificação da reactividade da cisteína incluem biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaocetainodiamina, Oda et al. (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) Biotina-BMCC, PEO-Iodoacetil-Biotina, Iodoacetil-LC-Biotina, e Biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.), e N-(3-maleimidilpropionil)biocitina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Outras fontes comerciais para biotinilação, reagentes ligantes bifuncionais e multifuncionais incluem Molecular Probes, Eugene, OR, e Sigma, St. Louis, MO.

Um "anticorpo progenitor" é um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos da qual um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos por um ou mais resíduos de cisteína. O anticorpo progenitor pode compreender uma sequência nativa ou de tipo selvagem. O anticorpo progenitor pode ter modificações preexistentes na sequência de aminoácidos (tais como adições, deleções e/ou substituições) relativamente a outras formas nativas, de tipo selvagem ou modificadas de um anticorpo. Um anticorpo progenitor pode ser dirigido contra um antigénio alvo de interesse, e.g. um polipeptído biologicamente importante. Os anticorpos dirigidos contra antigénios não polipeptídicos (tais como antigénios glicolipídicos associados a tumores; veja-se US 5091178) estão também contemplados.

"Afinidade de ligação" genericamente refere-se à força da soma total de interacções não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (e.g., um anticorpo) e o seu parceiro de ligação (e.g., um antigénio). A menos que indicado de outro modo, como aqui se utiliza, "afinidade de ligação" refere-se à afinidade de ligação intrínseca que reflecte uma interacção 1:1 entre membros de um par de ligação (e.g., anticorpo e antigénio). A afinidade de uma molécula X para com o seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (K_d). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na especialidade, incluindo os que são aqui descritos. Os anticorpos de baixa afinidade geralmente ligam-se ao antigénio lentamente e tendem a dissociar-se facilmente, enquanto os anticorpos de elevada afinidade geralmente ligam-se ao antigénio mais rapidamente e tendem a permanecer ligados mais tempo. Uma variedade de métodos de medição da afinidade de ligação são conhecidos na especialidade, e qualquer deles pode ser utilizado para os fins da presente invenção. Concretizações ilustrativas específicas estão descritas no que se segue.

Numa concretização, a " K_d " ou o "valor de K_d " de acordo com a presente invenção é medido através de um ensaio de ligação ao antigénio radiomarcado (RIA) realizado com a versão Fab de um anticorpo de interesse e o seu antigénio como descrito pelo ensaio seguinte. A afinidade de ligação em solução dos Fab relativamente ao antigénio é medida equilibrando o Fab com uma concentração mínima de antigénio marcado com (^{125}I) na presença de uma série de titulação de antigénio não marcado, e depois capturando o antigénio ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881). Para estabelecer condições para o ensaio, as placas de microtípulo (Dynex) são revestidas durante a noite com 5 µg/ml de um anticorpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) em carbonato de sódio 50 mM (pH 9,6), e subsequentemente são bloqueadas com albumina sérica bovina a 2% (p/v) em PBS durante duas a cinco horas à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Numa placa não adsorvente (Nunc #269620), misturam-se 100 pM ou 26 pM de [^{125}I]-antigénio com diluições em série de um Fab de interesse (e.g., consistente com a determinação do anticorpo anti-VEGF, Fab-12, em Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). O Fab de interesse é então incubado durante a noite; contudo, a

incubação pode continuar durante um período mais longo (e.g., cerca de 65 horas) para assegurar que é atingido o equilíbrio. Posteriormente, as misturas são transferidas para a placa de captura para incubação à temperatura ambiente (e.g., durante uma hora). A solução é depois removida e a placa é lavada oito vezes com Tween-20 a 0,1% em PBS. Quando as placas secam, adicionam-se 150 µl/poço de cintilante (MicroScint-20; Packard), e contam-se as placas num contador gama Topcount (Packard) durante dez minutos. As concentrações de cada Fab que originam 20%, ou menos, da ligação máxima são escolhidas para utilização em ensaios de ligação competitiva.

De acordo com outra concretização, Kd ou o valor de Kd é medido utilizando ensaios de ressonância plasmónica de superfície utilizando um BIACoreTM-2000 ou um BIACoreTM-3000 (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com *chips* CM5 de抗igénio imobilizado a ~10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, *chips* biossensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACore® Inc.) são activados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O抗igénio é diluído com acetato de sódio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes da injecção a um caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injecção de抗igénio, injecta-se etanolamina 1 M para bloquear grupos que não reagiram. Para medições cinéticas, injectam-se diluições em série de duas vezes de Fab (0,78 nM a 500 nM) em PBS com Tween 20 a 0,05% (PBST) a 25°C a um caudal de aproximadamente 25 µl/min. As velocidades de associação (k_{on}) e as velocidades de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação de Langmuir simples de um-para-um (BIACore® Evaluation Software version 3.2) ajustando simultaneamente os sensorgramas de associação e de dissociação. A constante de equilíbrio de dissociação (Kd) é calculada como a razão k_{off}/k_{on} . Veja-se, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881. Se a velocidade de associação exceder 106 M-1 s-1 no ensaio de ressonância plasmónica de superfície anterior, então a velocidade de associação pode ser determinada utilizando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, 16 nm de passagem de

banda) a 25°C de um anticorpo anti-antigénio 20 nM (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antigénio como medido num espectrómetro, tal como um espectrofotómetro equipado com interruptor de fluxo (Aviv Instruments) ou um espectrofotómetro SLM-Aminco 8000-series (ThermoSpectronic) com uma cuvete agitada.

Uma "velocidade de associação" ou " k_{on} " de acordo com a presente invenção pode também ser determinada como descrito acima utilizando um sistema BIACore™-2000 ou BIACore™-3000 (BIACore®, Inc., Piscataway, NJ).

Uma "desordem" é qualquer condição ou doença que irá beneficiar de tratamento com uma substância/molécula ou método da invenção. Estas incluem desordens crónicas e agudas incluindo as condições patológicas que predispõem o mamífero à desordem em questão. Exemplos não limitantes de desordens a tratar aqui incluem condições cancerosas tais como cancros ou metástases da próstata, do pulmão e do cólon.

As expressões "desordem proliferativa celular" e "desordem proliferativa" referem-se a desordens que estão associadas a algum grau de proliferação celular anormal. Numa concretização, a desordem proliferativa celular é o cancro.

"Tumor", como aqui se utiliza, refere-se a todo o crescimento e proliferação celulares neoplásicos, sejam malignos ou benignos, e a todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. Os termos "cancro", "canceroso", "desordem proliferativa celular", "desordem proliferativa" e "tumor" não são mutuamente exclusivos como aqui referido.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se a, ou descrevem, a condição fisiológica nos mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Os exemplos de cancro incluem, mas não se lhes limitando, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais particulares destes cancros incluem cancro de células escamosas (e.g. cancro de células escamosas epiteliais), cancro do pulmão incluindo cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma

escamoso do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro ovariano, cancro do fígado, cancro da bexiga, cancro do tracto urinário, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro rectal, cancro colorrectal, carcinoma do endométrio ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim ou renal, cancro da próstata, cancro vulvar, cancro da tiróide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, mieloma múltiplo e linfoma de células B, cancro do cérebro, assim como da cabeça e pescoço, e metástases associadas.

Uma "célula que expressa STEAP-1" é uma célula que expressa STEAP-1 endógena ou transfetada na superfície celular. Um "cancro que expressa STEAP-1" é um cancro compreendendo células que possuem proteína STEAP-1 presente na superfície celular. Um "cancro que expressa STEAP-1" produz suficientes níveis de STEAP-1 na superfície das suas células, de modo que um anticorpo anti-STEAP-1 se lhes pode ligar e ter um efeito terapêutico em relação ao cancro. Um cancro que "sobre-expressa" STEAP-1 é um que tem níveis significativamente mais elevados de STEAP-1 na superfície das suas células, comparativamente com uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Esta sobre-expressão pode ser causada por amplificação génica ou por transcrição ou tradução aumentadas. A sobre-expressão de STEAP-1 pode ser determinada num ensaio de diagnóstico ou prognóstico avaliando os níveis aumentados da proteína STEAP-1 presente na superfície de uma célula (*e.g.* através de um ensaio imuno-histoquímico; análise FACS). Alternativamente, ou adicionalmente, podem-se medir os níveis de ARNm, ácido nucleico que codifica STEAP-1, na célula, *e.g.* através de técnicas de hibridação *in situ* fluorescente; (FISH; veja-se WO98/45479 publicado em Outubro, 1998), *Southern blotting*, *Northern blotting* ou reacção em cadeia pela polimerase (PCR), tal como PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). Pode-se também estudar a sobre-expressão de STEAP-1 medindo抗igénio extravasado num fluido biológico tal como soro, *e.g.*, utilizando ensaios à base de anticorpos (veja-se também, *e.g.*, Patente U.S. 4,933,294 concedida em 12 de Junho, 1990; WO91/05264 publicado em 18 de Abril, 1991; Patente U.S. 5,401,638 concedida em 28 de Março, 1995; e Sias *et al.* *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Para além dos ensaios

anteriores, estão disponíveis vários ensaios *in vivo* aos técnicos especialistas. Por exemplo, podem-se expor as células no interior do corpo do paciente a um anticorpo que está opcionalmente marcado com um marcador detectável, e.g. um isótopo radioactivo, e pode-se avaliar a ligação do anticorpo a células no paciente, e.g. por varrimento externo quanto a radioactividade ou por análise de uma biópsia obtida de um paciente previamente exposto ao anticorpo. Um cancro que expressa STEAP-1 inclui cancro da próstata, do pulmão e do colón.

Como aqui se utiliza, "tratamento" (e variações tais como "tratar") refere-se à intervenção clínica numa tentativa de alterar o decorrer natural do indivíduo ou da célula a tratar, e pode ser realizado para profilaxia ou durante o decorrer da patologia clínica. Os efeitos desejáveis do tratamento incluem a prevenção da ocorrência ou recorrência da doença, alívio de sintomas, diminuição de quaisquer consequências patológicas directas ou indirectas da doença, prevenção de metástases, diminuição da velocidade de progressão da doença, melhoria ou paliação do estado de doença, e remissão ou prognóstico melhorado. Em algumas concretizações, os anticorpos da invenção são utilizados para retardar o desenvolvimento de uma doença ou desordem ou para retardar a progressão de uma doença ou desordem.

Os parâmetros anteriores para determinação do sucesso de um tratamento e da melhoria na doença são prontamente mensuráveis por procedimentos de rotina familiares a um médico. Para a terapia do cancro, a eficácia pode ser medida, por exemplo, por determinação do tempo até à progressão da doença (TTP) e/ou por determinação da taxa de resposta (RR). Para o cancro da próstata, a progressão da terapia pode ser determinada por métodos de rotina, usualmente por medição dos níveis de PSA no soro (antigénio específico da próstata); quanto mais elevado o nível de PSA no sangue, mais extenso é o cancro. Estão disponíveis ensaios comerciais para detecção do PSA, e.g., os kits de ensaio de PSA Tandem-E e Tandem-R da Hybitech, o ensaio policlonal ProsCheck da Yang (Yang Labs, Bellevue, WA), o Imx da Abbott (Abbott Labs, Abbott Park, IL), etc. A metástase pode ser determinada encenando testes e por varrimento ósseo e testes ao nível do cálcio e outras enzimas para determinar a

disseminação para o osso. Podem também ser realizados varrimentos de CT para observar a disseminação para a pélvis e nódulos linfáticos na área. Raios-x ao tórax e medição dos níveis das enzimas hepáticas por métodos conhecidos são utilizados para procurar metástases nos pulmões e no fígado, respectivamente. Outros métodos de rotina para a monitorização da doença incluem ultrassonografia transrectal (TRUS) e biopsia transrectal com agulha (TRNB).

Um "indivíduo" é um vertebrado. Em determinadas concretizações, o vertebrado é um mamífero. Os mamíferos incluem, mas não se lhes limitam, animais de criação (tais como vacas), animais de desporto, domésticos (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, ratinhos e ratos. Em determinadas concretizações, um mamífero é um ser humano.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para se conseguir o resultado terapêutico ou profiláctico desejado. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma substância/molécula da invenção pode variar de acordo com factores tais como o estado de doença, a idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade da substância/molécula, para eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz abrange uma quantidade em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da substância/molécula são ultrapassados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para se conseguir o resultado profiláctico desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, como uma dose profiláctica é utilizada nos indivíduos antes, ou num estágio precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz. No caso do cancro, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerosas; reduzir a dimensão do tumor; inibir (*i.e.*, retardar em alguma extensão e preferivelmente parar) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir (*i.e.*, retardar em alguma extensão e preferivelmente parar) a metástase tumoral; inibir, em alguma extensão, o crescimento tumoral; e/ou aliviar em alguma extensão um ou mais dos sintomas associados ao cancro. Veja-se a definição precedente de

"tratamento". Na medida em que o fármaco possa prevenir o crescimento e/ou matar células cancerosas existentes, pode ser citostático e/ou citotóxico.

Administração "crónica" refere-se à administração do(s) agente(s) num modo contínuo em oposição a um modo agudo, de modo a manter o efeito terapêutico (actividade) inicial durante um período de tempo prolongado. Administração "intermitente" é o tratamento que não é consecutivamente realizado sem interrupção, mas, é sim, de natureza cíclica.

Administração "em combinação com" um ou mais outros agentes terapêuticos inclui a administração simultânea (concorrente) e consecutiva por qualquer ordem.

"Transportadores", como aqui se utiliza, incluem transportadores, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis que não são tóxicos para a célula ou para o mamífero que lhe é exposto nas dosagens e concentrações empregues. Frequentemente, o transportador fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Os exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipeptído de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; aldóis tais como manitol ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN™, polietilenoglicol (PEG) e PLURONICS™.

"Marcador", como aqui se utiliza, refere-se a um composto ou uma composição detectáveis que são conjugados directamente ou indirectamente com o anticorpo de modo a gerar um anticorpo "marcado". O marcador pode ser detectável por si só (e.g. marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar uma alteração

química de um composto ou uma composição substrato que é detectável.

A expressão "marcado com epítopo" aqui utilizada refere-se a um polipéptido quimérico compreendendo um polipéptido do anticorpo anti-PSCA fundido com um "polipéptido marcador". O polipéptido marcador possui suficientes resíduos para proporcionar um epítopo contra o qual um anticorpo possa ser criado, e é no entanto suficientemente curto para que não interfira com a actividade do polipéptido de Ig ao qual está fundido. O polipéptido marcador é também preferivelmente francamente único para que o anticorpo não reaja cruzadamente de modo substancial com outros epítopos. Os polipéptidos marcadores adequados geralmente possuem pelo menos seis resíduos de aminoácido e usualmente entre cerca de 8 e 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente, entre cerca de 10 e 20 resíduos de aminoácido).

Uma "molécula pequena" é aqui definida como possuindo um peso molecular inferior a cerca de 500 Daltons.

A expressão "bula de embalagem" é utilizada para referir as instruções normalmente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informação acerca das indicações, utilização, dosagem, administração, contra-indicações e/ou advertências relativamente à utilização destes produtos terapêuticos.

Um "ácido nucleico isolado" é um ácido nucleico, *e.g.*, um ARN, um ADN ou um polímero misto, que está substancialmente separado de outras sequências de ADN do genoma assim como de proteínas ou complexos tais como ribossomas e polimerases, que acompanham naturalmente uma sequência nativa. A expressão abrange uma sequência de ácido nucleico que foi removida do seu ambiente de ocorrência natural, e inclui isolados de ADN recombinantes ou clonados e análogos sintetizados quimicamente ou análogos sintetizados biologicamente por sistemas heterólogos. Uma molécula substancialmente pura inclui formas isoladas da molécula.

"Vector" inclui vectores vaivém e de expressão. Tipicamente, a construção plasmídica também incluirá uma origem

de replicação (e.g., a origem de replicação ColE) e um marcador seleccionável (e.g., resistência a ampicilina ou a tetraciclina), para replicação e selecção, respectivamente, dos plasmídeos em bactérias. Um "vector de expressão" refere-se a um vector que contém as sequências de controlo ou elementos reguladores necessários para a expressão dos anticorpos incluindo fragmentos de anticorpo da invenção, em células bacterianas ou eucariotas. Os vectores adequados estão divulgados adiante.

A célula que produz um anticorpo anti-STEAP da invenção incluirá a célula de hibridoma progenitora e.g., os hibridomas que estão depositados na ATCC, assim como células hospedeiras bacterianas e eucariotas nas quais foi introduzido ácido nucleico que codifica os anticorpos. As células hospedeiras adequadas estão divulgadas adiante.

Um "agente inibidor do crescimento", quando aqui utilizado, refere-se a um composto ou uma composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente uma célula cancerosa que expressa PSCA, quer *in vitro* ou *in vivo*. Assim, o agente inibidor do crescimento pode ser um que reduza significativamente a percentagem de células que expressam PSCA em fase S. Os exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão no ciclo celular (num local que não a fase S), tais como agentes que induzem paragem em G1 e paragem em fase M. Os bloqueadores clássicos de fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores de topoisomerase II tais como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param em fase G1 também extravasam para paragem em fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Pode-se encontrar informação adicional em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente na p. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticancerosos, ambos derivados do teixo. O docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é um análogo semi-sintético do paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers

Squibb). O paclitaxel e o docetaxel promovem a montagem de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam os microtúbulos prevenindo a despolidimerização, o que resulta na inibição da mitose nas células.

A expressão "agente citotóxico", como aqui se utiliza, refere-se a uma substância que inibe ou previne uma função celular e/ou causa a morte ou destruição celulares. Na expressão pretendem-se incluir isótopos radioactivos (e.g., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapêuticos (e.g., metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorrubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina ou outros agentes intercalantes, enzimas e seus fragmentos tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos e toxinas tais como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo seus fragmentos e/ou variantes, toxinas, agentes inibidores do crescimento, porções de fármaco, e os vários agentes antitumorais ou anticancerosos adiante divulgados. Outros agentes citotóxicos são descritos adiante. Um agente tumoricida provoca a destruição de células tumorais.

Uma "toxina" é qualquer substância susceptível de possuir um efeito prejudicial sobre o crescimento ou a proliferação de uma célula.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento do cancro. Os exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tais como busulfano, improsulfano e piposulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilololomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetra-hidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina e 9-aminocamptotecina);

briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de azoto tais como clorambugilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostrada de uracilo; nitrosoureas tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enediina (e.g., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 11 e caliqueamicina ómega 11 (veja-se, e.g., Agnew, *Chem Int'l. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; assim como cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-supra-renais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico tais como ácido frolinico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo;

bisanreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínia; uma epotilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinano; lonidainina; maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; moidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complexo de polissacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromo; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxóides, e.g., paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™Cremophor-free, formulação de nanopartículas manipuladas com albumina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), e docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucilo; gencitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN®); platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico; capecitabina (XELODA®); sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos anteriores; assim como combinações de dois ou mais dos anteriores tais como CHOP, uma abreviatura para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviatura para um regime de tratamento com oxaliplatin (ELOXATIN™) combinada com 5-FU e leucovovina.

Estão também incluídos nesta definição os agentes anti-hormonais que actuam para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos de hormonas que podem promover o crescimento do cancro, e estão frequentemente na forma de tratamento sistémico, ou de corpo completo. Podem ser eles próprios hormonas. Os exemplos incluem anti-estrogénios e moduladores selectivos de receptores de estrogénios (SERM), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo o tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno

EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY 117018, onapristona e toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; infra-reguladores de receptores de estrogénios (ERD); agentes que funcionam para suprimir ou "desligar" os ovários, por exemplo, agonistas da hormona libertadora da hormona leutinizante (LHRH) tais como acetato leuprolide LUPRON® e ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina e triptereleina; outros anti-androgénios tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrogénio nas glândulas supra-renais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestana, fadrozole, vorozole RIVISOR®, letrozole FEMARA® e anastrozole ARIMIDEX®. Em adição, esta definição de agentes quimioterapêuticos inclui bisfosfonatos tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® ou risedronato ACTONEL®; assim como troxacicatrina (um análogo do nucleórido de citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos anti-sentido, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicadas em proliferação celular aberrante, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras e receptor do factor crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas tais como a vacina THERATOPE® e vacinas de terapia génica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; inibidor de topoisomerase 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (um inibidor de molécula pequena de tirosina-quinase dual ErbB-2 e EGFR também conhecido como GW572016); e sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos anteriores.

Um "agente inibidor do crescimento", quando aqui utilizado, refere-se a um composto ou uma composição que inibem o crescimento de uma célula (tal como uma célula que expressa STEAP-1) quer *in vitro* ou *in vivo*. Assim, o agente inibidor do crescimento pode ser um que reduz significativamente a percentagem de células (tais como células que expressam STEAP-1) em fase S. Os exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num lugar que não a fase S), tais como agentes que induzem

paragem em G1 e paragem em fase M. Os bloqueadores clássicos de fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos, e inibidores de topoisomerase II tais como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param em G1 também extravasam para paragem em fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Pode-se encontrar informação adicional em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente na p. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticancerosos, ambos derivados do teixo. O docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é um análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). O paclitaxel e o docetaxel promovem a montagem de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam os microtúbulos prevenindo a despolimerização, o que resulta na inibição da mitose nas células.

A expressão "metabolito intracelular" refere-se a um composto resultante de um processo ou reacção metabólicos no interior de uma célula num conjugado anticorpo-fármaco (ADC). O processo ou reacção metabólicos podem ser um processo enzimático, tal como uma clivagem proteolítica de um ligante peptídico do ADC, ou uma hidrólise de um grupo funcional tal como uma hidrazona, um éster ou uma amida. Os metabolitos intracelulares incluem, mas não se lhes limitam, anticorpos e fármaco livre que sofreram clivagem intracelular após entrada, difusão, assimilação ou transporte para uma célula.

As expressões "clivado intracelularmente" e "clivagem intracelular" referem-se a um processo ou reacção metabólicos no interior de uma célula num conjugado anticorpo-fármaco (ADC) através do qual a fixação covalente, i.e. ligante, entre a porção de fármaco (D) e o anticorpo (Ab) é quebrada, resultando o fármaco livre dissociado do anticorpo no interior da célula. As porções clivadas do ADC são assim metabolitos intracelulares.

O termo "biodisponibilidade" refere-se à disponibilidade sistémica (i.e., níveis no sangue/plasma) de uma determinada

quantidade de fármaco administrada a um paciente. A biodisponibilidade é um termo absoluto que indica a medição da quantidade no tempo (taxa) e total (extensão) de fármaco que atinge a circulação geral a partir de uma forma de dosagem administrada.

A expressão "actividade citotóxica" refere-se a um efeito de morte celular, citostático ou inibidor do crescimento de um conjugado anticorpo-fármaco ou de um metabolito intracelular de um conjugado anticorpo-fármaco. A actividade citotóxica pode ser expressa como o valor de IC₅₀, que é a concentração (molar ou em massa) por unidade de volume a que metade das células sobrevive.

"Alquilo" é um hidrocarboneto C₁-C₁₈ contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cílicos. Os exemplos são metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃).

O termo "alquilo C₁-C₈", como aqui se utiliza, refere-se a um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada, saturado ou insaturado possuindo de 1 a 8 átomos de carbono. Os grupos "alquilo C₁-C₈" representativos incluem, mas não se lhes limitando, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo e -n-decilo; enquanto os alquilos C₁-C₈ ramificados incluem, mas não se lhes limitando, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, os alquilos C₁-C₈ insaturados

incluem, mas não se lhes limitando, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo. Metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, iso-hexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metil-hexilo, 2,2-dimetil-hexilo, 2,4-dimetil-hexilo, 2,5-dimetil-hexilo, 3,5-dimetil-hexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metil-heptilo, 3-metil-heptilo, n-heptilo, iso-heptilo, n-octilo e iso-octilo. Um grupo alquilo C₁-C₈ pode ser não substituído ou substituído com um ou mais grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogéneo, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; onde cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo C₁-C₈ e arilo.

"Alcenilo" é um hidrocarboneto C₂-C₁₈ contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cílicos com pelo menos um local de insaturaçāo, i.e. uma ligação dupla sp², carbono-carbono. Os exemplos incluem, mas não se lhes limitando: etileno ou vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) e 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)

"Alcinilo" é um hidrocarboneto C₂-C₁₈ contendo átomos de carbono normais, secundários, terciários ou cílicos com pelo menos um local de insaturaçāo, i.e. uma ligação tripla sp, carbono-carbono. Os exemplos incluem, mas não se lhes limitando: acetilénico (-C≡CH) e propargilo (-CH₂C≡CH),

"Alquileno" refere-se a um radical hidrocarboneto saturado, de cadeia linear ou ramificada ou cílica de 1-18 átomos de carbono, e possuindo dois centros radicalares monovalentes derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio do mesmo ou de dois átomos de carbono diferentes de um alcano progenitor. Os radicais alquileno típicos incluem, mas não se

lhes limitando: metileno ($-\text{CH}_2-$) 1,2-etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-propilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) e 1,4-butilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

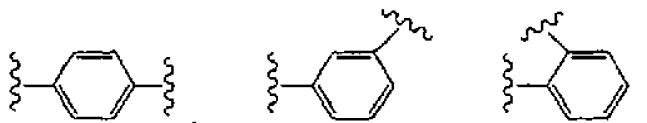
Um "alquileno $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ " é um grupo hidrocarboneto de cadeia linear, saturado, com a fórmula $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Os exemplos de um alquileno $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ incluem metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno e decaleno.

"Alcenileno" refere-se a um radical hidrocarboneto insaturado, de cadeia linear ou ramificada ou cíclica de 2-18 átomos de carbono, e possuindo dois centros radicalares monovalentes derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio do mesmo ou de dois átomos de carbono diferentes de um alceno progenitor. Os radicais alcenileno típicos incluem, mas não se lhes limitando: 1,2-etileno ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

"Alcinileno" refere-se a um radical hidrocarboneto insaturado, de cadeia linear ou ramificada ou cíclica de 2-18 átomos de carbono, e possuindo dois centros radicalares monovalentes derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio do mesmo ou de dois átomos de carbono diferentes de um alcino progenitor. Os radicais alcinileno típicos incluem, mas não se lhes limitando: acetileno ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), propargilo ($-\text{CH}\equiv\text{C}-$) e 4-pentinilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

"Arilo" refere-se a um grupo carbocíclico aromático. Os exemplos de grupos arilo incluem, mas não se lhes limitando, fenilo, naftilo e antracenilo. Um grupo carbocíclico aromático ou um grupo heterocíclico aromático podem ser não substituídos ou substituídos com um ou mais grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $-\text{O}-$ (alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$), -arilo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -halogéneo, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ e $-\text{CN}$; em que cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ e arilo.

Um "arileno" é um grupo arilo que possui duas ligações covalentes e pode estar nas configurações *ortho*, *meta* ou *para* como mostrado nas seguintes estruturas:



em que o grupo fenilo pode ser não substituído ou substituído com até quatro grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogéneo, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; em que cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo C₁-C₈ e arilo.

"Arilalquilo" refere-se a um radical alquilo acíclico em que um dos átomos de hidrogénio ligados a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp³, está substituído por um radical arilo. Os grupos arilalquilo típicos incluem, mas não se lhes limitando, benzilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-fenileten-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftileten-1-ilo, naftobenzilo e 2-naftofeniletan-1-ilo. O grupo arilalquilo compreende 6 a 20 átomos de carbono, e.g. a porção alquilo, incluindo grupos alcanilo, alcenilo ou alcinilo, do grupo arilalquilo tem 1 a 6 átomos de carbono e a porção arilo tem 5 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" refere-se a um radical alquilo acíclico em que um dos átomos de hidrogénio ligados a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp³, está substituído por um radical heteroarilo. Os grupos heteroarilalquilo típicos incluem, mas não se lhes limitando, 2-benzimidazolilmetilo e 2-furiletilo. O grupo heteroarilalquilo compreende 6 a 20 átomos de carbono, e.g. a porção alquilo, incluindo grupos alcanilo, alcenilo ou alcinilo, do grupo heteroarilalquilo tem 1 a 6 átomos de carbono e a porção heteroarilo tem 5 a 14 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S. A porção heteroarilo do grupo heteroarilalquilo pode ser um monociclo possuindo 3 a 7 membros no anel (2 a 6 átomos de carbono ou um biciclo possuindo 7 a 10 membros no anel (4 a 9 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S), por exemplo: um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6].

"Alquilo substituído", "arilo substituído" e "arilalquilo substituído" significam alquilo, arilo e arilalquilo, respectivamente, em que um ou mais átomos de hidrogénio estão, cada um independentemente, substituídos por um substituinte. Os substituintes típicos incluem, mas não se lhes limitando, -X,

$-R$, $-O^-$, $-OR$, $-SR$, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $NC(=O)R$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$, $-C(=NR)NR_2$, onde cada X é independentemente um halogéneo: F, Cl, Br ou I; e cada R é independentemente $-H$, alquilo C_2-C_{18} , arilo C_6-C_{20} , heterociclo C_3-C_{14} , um grupo protector ou uma porção pró-fármaco. Grupos alquíleno, alceníleno e alciníleno como descrito acima podem também estar similarmente substituídos.

"Heteroarilo" e "heterociclo" referem-se a um sistema de anel em que um ou mais átomos do anel são heteroátomos, e.g. azoto, oxigénio e enxofre. O radical heterociclo comprehende 1 a 20 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S. Um heterociclo pode ser um monociclo possuindo 3 a 7 membros no anel (2 a 6 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S) ou um bicingulo possuindo 7 a 10 membros no anel (4 a 9 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S), por exemplo: um sistema bicingulo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6].

Heterociclos estão descritos em Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente nos Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, e 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 até ao presente), em particular nos Volumes 13, 14, 16, 19, e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Os exemplos de heterociclos incluem, a título de exemplo e não como limitação, piridilo, di-hidropiridilo, tetra-hidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetra-hidrotiofenilo, tetra-hidrotiofenilo oxidado por enxofre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetra-hidrofuranilo, bis-tetra-hidrofuranilo, tetra-hidropiranilo, bis-tetra-hidropiranilo, tetra-hidro-quinolinilo, tetra-hidro-isoquinolinilo, deca-hidro-

quinolinilo, octa-hidro-isoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxyazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

A título de exemplo e não como limitação, os heterociclos ligados por carbono estão ligados na posição 2, 3, 4, 5 ou 6 de uma piridina, na posição 3, 4, 5 ou 6 de uma piridazina, na posição 2, 4, 5 ou 6 de uma pirimidina, na posição 2, 3, 5 ou 6 de uma pirazina, na posição 2, 3, 4 ou 5 de um furano, tetra-hidrofuran, tiofurano, tiofeno, pirrole ou tetra-hidropirrole, na posição 2, 4 ou 5 de um oxazole, imidazole ou tiazole, na posição 3, 4 ou 5 de uma isoxazole, pirazole ou isotiazole, na posição 2 ou 3 de uma aziridina, na posição 2, 3 ou 4 de uma azetidina, na posição 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 de uma quinolina ou na posição 1, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 de uma isoquinolina. Ainda mais tipicamente, os heterociclos ligados por carbono incluem 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidi-nilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo ou 5-tiazolil.

A título de exemplo e não como limitação, os heterociclos ligados por azoto estão ligados na posição 1 de uma aziridina, azetidina, pirrole, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazole, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazole, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indole, indolina, 1H-indazole, na posição 2 de um isoindole ou isoindolina, na posição 4 de uma morfolina, e na posição 9 de um carbazole ou -carbolina. Ainda mais

tipicamente, os heterociclos ligados por azoto incluem 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo e 1-piperidinilo.

Um "heterociclo C₃-C₈" refere-se a um carbociclo C₃-C₈ aromático ou não aromático em que um a quatro dos átomos de carbono do anel estão independentemente substituídos por um heteroátomo do grupo que consiste em O, S e N. Os exemplos representativos de um heterociclo C₃-C₈ incluem, mas não se lhes limitando, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo e tetrazolilo. Um heterociclo C₃-C₈ pode ser não substituído ou substituído com até sete grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogéneo, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; em que cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo C₁-C₈ e arilo.

"Heterociclo C₃-C₈" refere-se a um grupo heterociclo C₃-C₈ definido acima em que um dos átomos de hidrogénio do grupo heterociclo está substituído por uma ligação. Um heterociclo C₃-C₈ pode ser não substituído ou substituído com até seis grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogéneo, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; em que cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo C₁-C₈ e arilo.

"Carbociclo" significa um anel saturado ou insaturado possuindo 3 a 7 átomos de carbono na forma de um monociclo ou possuindo 7 a 12 átomos de carbono na forma de um biciclo. Os carbociclos monocíclicos possuem 3 a 6 átomos no anel, ainda mais tipicamente 5 ou 6 átomos no anel. Os carbociclos bicíclicos possuem 7 a 12 átomos no anel, e.g. dispostos na forma de um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6], ou possuem 9 ou 10 átomos no anel dispostos na forma de um sistema biciclo [5,6] ou [6,6]. Os exemplos de carbociclos monocíclicos incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-

1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclo-hex-1-enilo, 1-ciclo-hex-2-enilo, 1-ciclo-hex-3-enilo, ciclo-heptilo e ciclo-octilo.

Um "carbociclo C₃-C₈" é um anel carbocíclico não aromático saturado ou insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 membros. Os carbociclos C₃-C₈ representativos incluem, mas não se lhes limitando, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclo-hexilo, -ciclo-hexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclo-hexadienilo, -ciclo-heptilo, -1,3-ciclo-heptadienilo, -1,3,5-ciclo-hepta-trienilo, -ciclo-octilo e -ciclo-octadienilo. Um grupo carbociclo C₃-C₈ pode ser não substituído ou substituído com um ou mais grupos incluindo, mas não se lhes limitando, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogéneo, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ e -CN; onde cada R' é independentemente seleccionado entre H, -alquilo C₁-C₈ e arilo.

Um "carbociclo C₃-C₈" refere-se a um grupo carbociclo C₃-C₈ definido acima em que um dos átomos de hidrogénio do grupo carbociclo está substituído por uma ligação.

"Ligante" refere-se a uma porção química compreendendo uma ligação covalente ou uma cadeia de átomos que liga covalentemente um antícorpo a uma porção de fármaco. Em várias concretizações, os ligantes incluem um radical bivalente tal como um alquildiilo, um arildiilo, um heteroarildiilo, porções tais como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades repetidas de alquiloxi (e.g. polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) e alquilamino (e.g. polietilenoamino, JeffamineTM); e éster e amidas de diácido incluindo succinato, succinamida, diglicolato, malonato e caproamida.

O termo "quiral" refere-se a moléculas que possuem a propriedade de não sobreponibilidade com as suas imagens no espelho, enquanto o termo "aquiral" se refere a moléculas que são sobreponíveis com as suas imagens no espelho.

O termo "estereoisómeros" refere-se a compostos que possuem uma constituição química idêntica, mas diferem em relação ao arranjo dos átomos ou grupos no espaço.

"Diastereómero" refere-se a um estereoísomero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens no espelho uma da outra. Os diastereómeros possuem diferentes propriedades físicas, e.g. pontos de fusão, ponto de ebulação, propriedades espectrais e reactividades. As misturas de diastereómeros podem ser separadas por procedimentos analíticos de alta resolução tais como electroforese e cromatografia.

"Enantiómeros" referem-se a dois estereoísomeros de um composto que não são imagens no espelho sobreponíveis.

As definições e convenções estereoquímicas aqui utilizadas seguem geralmente S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; e Eliel, E. e Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente activas, i.e., têm a capacidade de rodar o plano da luz polarizada. Na descrição de um composto opticamente activo, os prefixos D e L, ou R e S, são utilizados para denotar a configuração absoluta da molécula em torno do(s) seu(s) centro(s) quiral(ais). Os prefixos d e l ou (+) e (-) são empregues para designar o sinal de rotação do plano da luz polarizada pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levo-rotatório. Um composto com o prefixo (+) ou d é dextro-rotatório. Para uma determinada estrutura química, estes estereoísomeros são idênticos excepto sendo imagens no espelho um do outro. Um estereoísomero específico pode também ser referido como um enantiómero, e uma mistura destes isómeros é frequentemente denominada uma mistura enantiomérica. Uma mistura 50:50 de enantiómeros é referida como uma mistura racémica ou um racemato, que pode ocorrer quando não houve estereoselección ou estereo especificidade numa reacção ou processo químicos. Os termos "mistura racémica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, desprovida de actividade óptica.

"Grupo rejeitado" refere-se a um grupo funcional que pode ser substituído por outro grupo funcional. Certos grupos rejeitados são bem conhecidos na especialidade, e os exemplos incluem, mas não se lhes limitando, um halogeneto (e.g., cloreto, brometo, iodeto), metanossulfonilo (mesilo),

p-toluenossulfônico (tosilo), trifluorometilsulfônico (triflato) e trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

COMPONENTES LIGANTES:

MC = 6-maleimidocaproílo

Val-Cit ou "vc" = valina-citrulina (um dipéptido exemplificativo num ligante clivável por protease)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureidopentanóico

PAB = p-aminobenziloxicarbonilo (um exemplo de uma componente ligante "auto-imolativa")

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (em que a ligação peptídica ligante foi modificada para impedir a sua clivagem por catepsina B)

MC(PEG) 6-OH = maleimidocaproíl-polietilenoglicol (pode ser ligado a cisteínas do anticorpo).

SPP = N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato

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

SMCC = succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato

IT = iminotiolano

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono-metilauristatina E (MW 718)

MMAF = variante de auristatina E (MMAE) com uma fenilalanina no terminal C do fármaco (MW 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF com DMAEA (dimetilaminoetilamina) numa ligação amida à fenilalanina C-terminal (MW 801,5)

MMAF-TEG = MMAF com tetraetilenoglicol esterificado na fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, ligado na forma de amida ao terminal C de MMAF

DM1 = N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercaptopropanoilo)maitansina

DM3 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercaptopropanoilo)maitansina

DM4 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercaptop-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

Outras abreviaturas são como se segue: AE é auristatina E, Boc é N-(t-butoxicarbonilo), cit é citrulina, dap é dolaproina, DCC é 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida, DCM é diclorometano, DEA é dietilamina, DEAD é dietilazodi-carboxilato, DEPC é dietilfosforilcianidato, DIAD é diisopropilazodicarboxilato, DIEA é N,N-diisopropiletilamina, dil é dolaisoleucina, DMA é dimetilacetamida, DMAP é 4-dimetilaminopiridina, DME é dimetiléter de etilenoglicol (ou 1,2-dimetoxietano), DMF é N,N-dimetilformamida, DMSO é dimetilsulfóxido, doe é dolafenina, dov é N,N-dimetilvalina, DTNB é 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), DTPA é ácido dietilenotriaminopenta-acético, DTT é ditiotreitol, EDCI é cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ é 2-etoxy-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina, ES-MS é espectrometria de massa com electropulverização, EtOAc é acetato de etilo, Fmoc é N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly é glicina, HATU é hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio, HOEt é 1-hidroxibenzotriazole, HPLC é cromatografia líquida de alta pressão, ile é isoleucina, lys é lisina, MeCN (CH₃CN) é acetonitrilo, MeOH é metanol, Mtr é 4-anisildifenilmetilo (ou 4-metoxitritilo), nor é (1S,2R)-(+)-norefedrina, PBS é solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4), PEG é polietilenoglicol, Ph é fenilo, Pnp é p-nitrofenilo, MC é 6-maleimidocaproílo, phe é L-fenilalanina, PyBrop é hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidinofosfónio, SEC é cromatografia de exclusão por tamanhos, Su é succinimida, TFA é ácido trifluoroacético, TLC é cromatografia de camada fina, UV é ultravioleta e val é valina.

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AS PREPARAR

São proporcionados anticorpos que se ligam a STEAP-1. São proporcionados imunoconjugados compreendendo anticorpos anti-STEAP-1. Os anticorpos e os imunoconjugados da invenção são úteis, e.g., para o diagnóstico ou o tratamento de desordens associadas a expressão alterada, e.g., expressão aumentada, de STEAP-1. Em determinadas concretizações, os anticorpos ou os imunoconjugados da invenção são úteis para o diagnóstico ou o tratamento de uma desordem proliferativa celular, tal como o cancro.

Anticorpos anti-STEAP-1

Num aspecto, a invenção proporciona anticorpos que se ligam a STEAP-1. Em algumas concretizações, são proporcionados anticorpos que se ligam a uma forma madura de STEAP-1 humana e de macaco *Cynomolgus* (*cyno*). Numa destas concretizações, uma forma madura de STEAP-1 humana possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (Figura 1). A STEAP-1 de *cyno* possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (Figura 1). Em algumas concretizações, um antícorpo contra STEAP-1 liga-se a uma forma madura de STEAP-1 expressa na superfície celular. Em algumas concretizações, um antícorpo que se liga a uma forma madura de STEAP-1 expressa na superfície celular inibe o crescimento da célula. Em algumas concretizações, um antícorpo anti-STEAP-1 liga-se a uma forma madura de STEAP-1 expressa na superfície celular e induz morte celular. Em algumas concretizações, um antícorpo anti-STEAP-1 liga-se a uma forma madura de STEAP-1 expressa na superfície de células cancerosas. Em algumas concretizações, um antícorpo anti-STEAP-1 liga-se a uma forma madura de STEAP-1 que é sobre-expressa na superfície de células cancerosas relativamente a células normais do mesmo tecido de origem. Em algumas concretizações, um antícorpo anti-STEAP-1 está conjugado com uma citotoxina ou um marcador detectável e liga-se a STEAP-1 na superfície de uma célula. Em algumas concretizações, o conjugado antícorpo-toxina inibe o crescimento da célula. Em algumas concretizações, o conjugado antícorpo-marcador detectável faz com que uma célula que expresse STEAP-1 na sua superfície seja detectável *in vitro* ou *in vivo*.

O antícorpo anti-STEAP-1 é um antícorpo monoclonal humanizado. O antícorpo anti-STEAP-1 pode ser um fragmento de antícorpo, *e.g.*, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv ou (Fab')₂. Num aspecto, qualquer dos anticorpos anti-STEAP-1 aqui descritos são purificados.

São aqui proporcionados anticorpos monoclonais exemplificativos derivados de uma biblioteca de fagos. O抗原 utilizado para rastreio da biblioteca foi um

polipéptido possuindo a sequência de sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:28 ou SEQ ID NO:30, correspondentes aos domínios extracelulares (ECD) de STEAP-1 beta e alfa. Os anticorpos resultantes do rastreio da biblioteca são maturados em afinidade.

São proporcionados anticorpos monoclonais que competem com 120.545 murino, enxerto 120 e 120v.24 humanizado pela ligação a STEAP-1. São também proporcionados anticorpos monoclonais que se ligam ao mesmo epítopo que o 120.545 murino, o enxerto 120 e o 120v.24 humanizado.

Num aspecto da invenção, são proporcionados polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1. Em determinadas concretizações, são proporcionados vectores compreendendo polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1. Em determinadas concretizações, são proporcionadas células hospedeiras compreendendo estes vectores. São proporcionadas composições compreendendo anticorpos anti-STEAP-1 ou polinucleótidos que codificam anticorpos anti-STEAP-1. Em determinadas concretizações, uma composição da invenção é uma formulação farmacêutica para utilização no tratamento de um cancro, tal como definido na reivindicação 16.

Segue-se uma descrição detalhada de anticorpos anti-STEAP-1 exemplificativos:

1. Concretizações específicas de anticorpos anti-STEAP-1

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:9 da Figura 2B. É também descrito um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:6 da Figura 2A.

A divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo uma cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:9, possuindo as seguintes alterações de aminoácidos na posição de Kabat indicada: A24V e opcionalmente uma ou mais de V37I, V48M, F67I, e L78F. A cadeia pesada compreende uma região de esqueleto da cadeia pesada FR-H1 de SEQ ID NO:25. Como aqui se utiliza, as regiões de esqueleto da cadeia pesada são designadas "FR-H1-H4" ou "HC-FR1-FR4", e as regiões de esqueleto da cadeia leve

são designadas "FR-L1-L4" ou "LC-FR1-FR4". A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo uma cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:6.

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo 6 das sequências HVR do anticorpo 120.v24 apresentadas nas Figuras 2A e 2B.

Genericamente, um anticorpo anti-STEAP-1 pode compreender qualquer sequência de esqueleto de domínio variável adequada, desde que o anticorpo retenha a capacidade de se ligar a STEAP-1. Por exemplo, em algumas concretizações, os anticorpos anti-STEAP-1 da invenção compreendem uma sequência de esqueleto de consenso da cadeia pesada do subgrupo III humano. A sequência de esqueleto de consenso da cadeia pesada pode compreender substituição(ões) na posição 24, 37, 48, 67 e/ou 78. A posição 24 pode ser A ou V, a posição 37 pode ser I ou V, a posição 48 pode ser M ou V, a posição 67 pode ser I ou F e/ou a posição 78 pode ser F ou L. Estes anticorpos podem compreender uma sequência de esqueleto de domínio variável da cadeia pesada de huMAB4D5-8, e.g., SEQ ID NO:21, 22, 23 e 24 (FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). huMAB4D5-8 é comercialmente conhecido como anticorpo anti-HER2 HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EUA; também referido nas Pat. U.S. 6,407,213 & 5,821,337, e Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93. Estes anticorpos podem compreender ainda uma sequência de esqueleto de consenso da cadeia leve I humana. Estes anticorpos podem compreender uma sequência de esqueleto de domínio variável da cadeia leve de huMAB4D5-8, e.g. SEQ ID NO:17, 18, 19 e 20 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).

Um anticorpo anti-STEAP-1 pode compreender um domínio variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de esqueleto e regiões hipervariáveis, em que a sequência de esqueleto compreende as sequências FR-H1-FR-H4 de SEQ ID NO:25 (FR-H1), 22 (FR-H2), 23 (FR-H3), e 24 (FR-H4), respectivamente; a HVR-H1 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14; a HVR-H2 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15; e a HVR-H3 compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16. Um anticorpo anti-STEAP-1 pode compreender um domínio variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de

esqueleto e regiões hipervariáveis, em que a sequência de esqueleto compreende as sequências FR-L1-FR-L4 de SEQ ID NOS:17, 18, 19 e 20, respectivamente; a HVR-L1 compreende a sequência de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS:11, 12 e 13. O domínio variável da cadeia pesada pode compreender SEQ ID NO:10 e o domínio variável da cadeia leve compreende SEQ ID NO:6.

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9 ou 10. Uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência pode conter substituições, inserções ou deleções relativamente à sequência de referência, mas um anticorpo compreendendo essa sequência de aminoácidos retém a capacidade de se ligar a STEAP-1. Um total de 1 a 10 aminoácidos podem ser substituídos, inseridos ou eliminados numa sequência de SEQ ID NO:9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78 e/ou 79. As substituições, inserções ou deleções podem ocorrer em regiões fora das HVR (*i.e.*, nas FR). Um anticorpo anti-STEAP-1 pode compreender um domínio variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia pesada como representado na Figura 2B (SEQ ID NO:10).

As sequências HVR e FR da cadeia pesada aqui descritas podem compreender as seguintes:

HVR-H1 (GYSITSDYAWN, SEQ ID NO:14)

HVR-H2 (GYISNSGSTSYNPSLKS, SEQ ID NO:15)

HVR-H3 (ERNYDYDDYYYAMDY, SEQ ID NO:16)

FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, SEQ ID NO:21)

FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS, SEQ ID NO:25)

FR-H2 (WVRQAPGKGLEWV, SEQ ID NO:22)

FR-H2 (WIRQAPGKGLEWV, SEQ ID NO:75)

FR-H2 (WVRQAPGKGLEWM, SEQ ID NO:76)

FR-H2 (WIRQAPGKGLEWM, SEQ ID NO:77)

FR-H3 (RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO:23)

FR-H3 (RITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO:78)

FR-H3 (RFTISRDNSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO:79)

FR-H4 (WGQGTLTVSS, SEQ ID NO:24)

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia leve como representado na Figura 2A (SEQ ID NO:6).

As sequências HVR da cadeia leve compreendem as seguintes:

HVR-L1 (KSSQSLLYRSNQKNYLA, SEQ ID NO:11)

HVR-L2 (WASTRES, SEQ ID NO:12)

HVR-L3 (QQYYNYPRT, SEQ ID NO:13).

As sequências FR da cadeia leve podem compreender as seguintes:

FR-L1 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC, SEQ ID NO:17);

FR-L2 (WYQQKPGKAPKLLIY, SEQ ID NO:18);

FR-L3 (GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC, SEQ ID NO:19)

FR-L4 (FGQGTKVEIKR, SEQ ID NO:20).

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. Uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência pode conter substituições, adições ou deleções relativamente à sequência de referência, mas um anticorpo compreendendo essa sequência de aminoácidos retém a capacidade de se ligar a STEAP-1. Um total de 1 a 10 aminoácidos podem ser substituídos, inseridos ou eliminados numa sequência seleccionada entre SEQ ID NO:6, 17, 18, 19, e 20. As substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das HVR (*i.e.*, nas FR). Em algumas concretizações, um anticorpo anti-STEAP-1 compreende um domínio variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo (a) um domínio variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO:9 e 10; e (b) um domínio variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. Uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência pode conter substituições, adições ou deleções relativamente à sequência de referência, mas um anticorpo compreendendo essa sequência de aminoácidos retém a capacidade de se ligar a STEAP-1. Um total de 1 a 10 aminoácidos podem ser substituídos, inseridos ou eliminados na sequência de referência, incluindo, mas não se lhes limitando, uma sequência seleccionada entre SEQ ID NO:9, 10, 21, 22, 23, 24, 75, 76, 77, 78, 79. As substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das HVR (*i.e.*, nas FR). Um anticorpo anti-STEAP-1 pode compreender um domínio variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e um domínio variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO:6.

A presente divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo (a) uma, duas ou três HVR de VH seleccionadas entre as apresentadas na Figura 2B e/ou (b) uma, duas ou três HVR de VL seleccionadas entre as apresentadas na Figura 2A. A divulgação proporciona um anticorpo anti-STEAP-1 compreendendo um domínio variável da cadeia pesada seleccionado entre os apresentados na Figura 2B e um domínio variável da cadeia leve seleccionado entre os apresentados na Figura 2A.

2. Fragmentos de anticorpo

A presente invenção abrange fragmentos de anticorpo. Os fragmentos de anticorpo podem ser gerados por meios tradicionais, tais como digestão enzimática, ou por técnicas recombinantes. Em certas circunstâncias há vantagens em utilizar fragmentos de anticorpo, em vez de anticorpos completos. A menor dimensão dos fragmentos permite uma rápida depuração, e pode conduzir a um acesso melhorado aos tumores

sólidos. Para uma revisão de certos fragmentos de anticorpo, veja-se Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos eram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, e.g., Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Contudo, estes fragmentos podem actualmente ser produzidos directamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpo Fab, Fv e scFv podem todos ser expressos e segregados por *E. coli*, desse modo permitindo a fácil produção de grandes quantidades destes fragmentos. Os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir das bibliotecas de anticorpos sobre fagos discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser directamente recuperados a partir de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados directamente da cultura de células hospedeiras recombinantes. Fragmentos Fab e F(ab')₂ com semivida *in vivo* aumentada compreendendo resíduos de epítopo de ligação a receptores selvagens estão descritos na Pat. U.S. 5,869,046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o perito na especialidade. Em determinadas concretizações, um anticorpo é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Veja-se WO 93/16185; Pat. U.S. 5,571,894; e 5,587,458. Os Fv e os scFv são as únicas espécies com locais de combinação intactos que estão desprovidas de regiões constantes; assim, podem ser adequados para uma ligação não específica reduzida durante a utilização *in vivo*. Podem ser construídas proteínas de fusão de scFv para obter a fusão de uma proteína efectora no terminal amino ou no terminal carboxi de um scFv. Veja-se *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", e.g., como descrito na Pat. U.S. 5,641,870, por exemplo. Estes anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

3. Anticorpos humanizados

A invenção abrange anticorpos humanizados. Vários métodos para humanização de anticorpos não humanos são conhecidos na

especialidade. Por exemplo, um anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados", que são tipicamente tomados de um domínio variável "de importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), substituindo pelas sequências da região hipervariável as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Desse modo, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. 4,816,567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos de FR estão substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto da cadeia leve como da pesada, para utilizar na preparação dos anticorpos humanizados pode ser importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o denominado método do "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é rastreada contra a totalidade da biblioteca de sequências conhecidas de domínios variáveis humanos. A sequência humana que é mais próxima da sequência do roedor é então aceite como o esqueleto humano para o anticorpo humanizado (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Outro método utiliza um esqueleto particular derivado da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. O mesmo esqueleto pode ser utilizado para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

É ainda geralmente desejável que os anticorpos sejam humanizados com retenção de elevada afinidade para com o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para conseguir este objectivo, de acordo com um método, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise

das sequências progenitoras e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências progenitoras e humanizadas. Os modelos tridimensionais de imunoglobulinas estão normalmente disponíveis e são familiares aos peritos na especialidade. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulinas candidatas seleccionadas. A inspecção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, i.e., a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar ao seu antígeno. Desta maneira, resíduos de FR podem ser seleccionados e combinados a partir das sequências do recebedor e importadas de modo a conseguir as características desejadas para o anticorpo, tais como afinidade aumentada para com o(s) antígeno(s) alvo. Em geral, os resíduos da região hipervariável estão directamente e muito substancialmente envolvidos na influência sobre a ligação ao antígeno.

4. Anticorpos Humanos

Podem ser construídos anticorpos anti-STEAP-1 humanos combinando sequência(s) de domínio variável de clones de Fv seleccionadas de bibliotecas de exibição em fagos derivadas de humanas com sequência(s) de domínio constante humanas conhecidas como descrito acima. Alternativamente, podem ser preparados anticorpos monoclonais anti-STEAP-1 humanos através do método do hibridoma. Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas, por exemplo, por Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); e Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

É hoje possível produzir animais transgénicos (e.g. ratinhos) que são capazes, após imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulinas endógenas. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união (JH) da cadeia pesada do anticorpo em ratinhos quiméricos e mutante da linha germinal resulta na completa inibição de

produção de anticorpos endógenos. A transferência do array de genes de imunoglobulina da linha germinal humana nestes ratinhos mutantes da linha germinal resultará na produção de anticorpos humanos após provocação com o antigénio. Veja-se, e.g., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Brugermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

O "baralhamento" de genes ("gene shuffling") pode também ser utilizado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos não humanos, e.g. de roedor, quando o anticorpo humano possui afinidades e especificidades similares às do anticorpo não humano de partida. De acordo com este método, que é também denominado "impressão de epítopos" ("epitope imprinting"), a região variável da cadeia pesada ou leve de um fragmento de anticorpo não humano obtida por técnicas de exibição em fagos como aqui descrito, é substituída por um repertório de genes do domínio V humano, criando uma população de quimeras de scFv ou Fab de cadeia não humana/cadeia humana. A selecção com antigénio resulta no isolamento de um scFv ou Fab quiméricos de cadeia não humana/cadeia humana em que a cadeia humana restaura o local de ligação ao antigénio destruído pela remoção da correspondente cadeia não humana no clone de exibição em fagos primário, i.e. o epítopo governa (imprime) a escolha do parceiro de cadeia humana. Quando o processo é repetido para substituir a restante cadeia não humana, obtém-se um anticorpo humano (veja-se PCT WO 93/06213 publicado em 1 de Abril, 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos não humanos por enxerto das CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não possuem resíduos de FR ou CDR de origem não humana.

5. Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais que possuem especificidades de ligação para com pelo menos dois antigénios diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser anticorpos humanos ou humanizados. Em determinadas concretizações, uma das especificidades de ligação é para com STEAP-1 e a outra é para com qualquer outro antigénio. Em determinadas concretizações, os anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítopos diferentes de STEAP-1. Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para direcionar

agentes citotóxicos para células que expressam STEAP-1. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a STEAP-1 e um braço que se liga a um agente citotóxico, tal como, e.g., saporina, anti-interferão-, alcalóide de vinca, cadeia A da ricina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioactivo. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados na forma de anticorpos de comprimento completo ou de fragmentos de anticorpo (e.g. anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Os métodos para a preparação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na especialidade. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas possuem diferentes especificidades (Milstein e Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Devido à distribuição aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta, que é usualmente realizada por passos de cromatografia de afinidade, é bastante complicada, e os rendimentos do produto são baixos. Procedimentos similares estão divulgados em WO 93/08829 publicado em 13 de Maio, 1993, e em Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, os domínios variáveis dos anticorpos com as especificidades de ligação (locais de combinação anticorpo-antígeno) desejadas são fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão, por exemplo, é com um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de charneira, CH2 e CH3. Em determinadas concretizações, a primeira região constante da cadeia pesada (CH1), contendo o local necessário para a ligação da cadeia leve, está presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codificam as fusões da cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, da cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados, que são co-transfetados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em concretizações em que proporções desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam os

rendimentos óptimos. É, contudo, possível inserir as sequências de codificação para duas ou para todas as três cadeias polipeptídicas num vector de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm particular significado.

Numa concretização desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrido (que proporciona uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações indesejadas de cadeias de imunoglobulina, pois a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona uma maneira fácil de separação. Esta abordagem é divulgada em WO 94/04690. Para mais detalhes da geração de anticorpos biespecíficos veja-se, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem, a interface entre um par de moléculas de antícorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinantes. A interface compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de antícorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de antícorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (e.g. tirosina ou triptofano). São criadas "cavidades" compensatórias de dimensão idêntica ou similar à(s) cadeia(s) lateral(ais) grandes na interface da segunda molécula de antícorpo substituindo as cadeias laterais de aminoácidos grandes por mais pequenas (e.g. alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero relativamente a outros produtos finais indesejados tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Estes anticorpos foram propostos, por exemplo, para direcionar

células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente US 4,676,980), e para o tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/00373, e EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser preparados utilizando qualquer método conveniente de reticulação. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na especialidade, e estão divulgados na Patente US 4,676,980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo foram também descritas na literatura. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

O recente progresso facilitou a recuperação directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico completamente humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento Fab' foi separadamente segregado a partir de *E. coli* e submetido a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobre-expressam o receptor de HER2 e células T humanas normais, assim como desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos tumorais da mama humanos.

Várias técnicas para preparar e isolar fragmentos de anticorpo biespecíficos directamente a partir da cultura de

células recombinantes foram também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos utilizando "fechos de correr" de leucinas. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos "fecho-de-correr" de leucinas das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão génica. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de charneira para formar monómeros e depois reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia dos "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) através de um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Desse modo, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios VL e VH complementares de outro fragmento, desse modo formando dois locais de ligação ao antigénio. Outra estratégia para preparar fragmentos biespecíficos de anticorpos utilizando dímeros de Fv de cadeia única (sFv) foi também reportada. Veja-se Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Estão contemplados anticorpos com mais do que duas valências. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

6. Anticorpos Multivalentes

Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antigénio ao qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos multivalentes (que são outros que não da classe IgM) com três ou mais locais de ligação ao antigénio (e.g. anticorpos tetravalentes), que podem ser prontamente produzidos por expressão recombinante de ácido nucleico que codifica as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais locais de ligação ao antigénio. Em determinadas concretizações, o domínio de dimerização compreende (ou consiste em) uma região Fc ou uma

região de charneira. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais locais de ligação ao antigénio amino-terminais relativamente à região Fc. Em determinadas concretizações, um anticorpo multivalente compreende (ou consiste em) três a cerca de oito locais de ligação ao antigénio. Numa destas concretizações, um anticorpo multivalente compreende (ou consiste em) quatro locais de ligação ao antigénio. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (por exemplo, duas cadeias polipeptídicas), em que a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) compreendem dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) podem compreender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, em que VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipéptido, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) podem compreender: VH-CH1-ligante flexível-VH-CH1-cadeia da região Fc; ou VH-CH1-VH-CH1-cadeia da região Fc. O anticorpo multivalente aqui pode compreender ainda pelo menos dois (por exemplo, quatro) polipéptidos de domínio variável da cadeia leve. O anticorpo multivalente aqui pode, por exemplo, compreender de cerca de dois a cerca de oito polipéptidos de domínio variável da cadeia leve. Os polipéptidos de domínio variável da cadeia leve contemplados aqui compreendem um domínio variável da cadeia leve e, opcionalmente, compreendem ainda um domínio CL.

7. Anticorpos de Domínio Único

Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo de domínio único. Um anticorpo de domínio único é uma cadeia polipeptídica única compreendendo a totalidade ou uma porção do domínio variável da cadeia pesada ou a totalidade ou uma porção do domínio variável da cadeia leve de um anticorpo. Um anticorpo de domínio único pode ser um anticorpo humano de domínio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; veja-se, e.g., Patente U.S. 6,248,516 B1). Um anticorpo de domínio único consiste na totalidade ou numa porção do domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo.

8. Variantes de Anticorpos

Em algumas concretizações, estão contempladas modificação(ões) na sequência de aminoácidos dos anticorpos

aqui descritos. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Podem ser preparadas variantes de sequência de aminoácidos do anticorpo por introdução de alterações apropriadas na sequência de nucleótidos que codifica o anticorpo, ou por síntese peptídica. Estas modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos no interior das sequências de aminoácidos do anticorpo. Pode ser feita qualquer combinação de deleção, inserção e substituição para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo do indivíduo no momento em que a sequência é preparada.

Um método útil para a identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagénese é denominado "mutagénese por varrimento de alaninas" como descrito por Cunningham e Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (e.g., resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (e.g., alanina ou polialanina) para afectar a interacção dos aminoácidos com o antigénio. As localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas por introdução de mais, ou outras, variantes em, ou em vez de, os locais de substituição. Assim, embora o local para introdução de uma variação na sequência de aminoácidos esteja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não precisa de ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num determinado local, é conduzida mutagénese por varrimento de ala ou aleatória no codão ou região alvo e as imunoglobulinas expressas são rastreadas quanto à actividade desejada.

As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões amino- e/ou carboxilo-terminais variando de comprimento desde um resíduo a polipeptídos contendo uma centena ou mais de resíduos, assim como inserções intra-sequência de resíduos de aminoácido únicos ou múltiplos. Os exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo de metionilo N-terminal. Outras variantes de inserção da molécula de

anticorpo incluem a fusão do terminal N ou do terminal C do anticorpo a uma enzima (e.g. para ADEPT) ou um polipéptido que aumenta a semivida no soro do anticorpo.

Em determinadas concretizações, um anticorpo da invenção é alterado para aumentar ou diminuir a extensão em que o anticorpo é glicosilado. A glicosilação de polipeptídos é tipicamente ligada a N ou ligada a O. Ligada a N refere-se à fixação de uma porção de hidrato de carbono na cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para fixação enzimática da porção hidrato de carbono à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de uma destas sequências tripeptídicas num polipeptído cria um potencial local de glicosilação. Glicosilação ligada a O refere-se à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose num hidroxiaminoácido, mais vulgarmente serina ou treonina, embora também possam ser utilizadas 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição ou a deleção de locais de glicosilação no anticorpo é convenientemente realizada por alteração da sequência de aminoácidos de modo a ser criada ou removida uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para locais de glicosilação ligada a N). A alteração pode também ser realizada através da adição, deleção ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligada a O).

Quando o anticorpo compreende uma região Fc, o hidrato de carbono a ela ligado pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com uma estrutura de hidratos de carbono matura que não possui fucose ligada a uma região Fc do anticorpo são descritos no pedido de Pat. US 2003/0157108 (Presta, L.). veja-se também US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticorpos com uma N-acetylglucosamina (GlcNAc) de bissecção no hidrato de carbono ligado a uma região Fc do anticorpo são referenciados em WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. e na Patente US 6,602,684, Umana et al. Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacárido ligado a uma região Fc do anticorpo estão reportados em WO 1997/30087, Patel et al. Veja-se, também, WO

1998/58964 (Raju, S.) e WO 1999/22764 (Raju, S.) relativamente a anticorpos com hidratos de carbono alterados ligados à sua região Fc. Veja-se também US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de ligação ao antigénio com glicosilação modificada.

Em determinadas concretizações, uma variante de glicosilação comprehende uma região Fc, em que uma estrutura de hidratos de carbono ligada à região Fc não possui fucose. Estas variantes possuem uma função de ADCC melhorada. Opcionalmente, a região Fc comprehende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram ainda mais a ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração Eu de resíduos). Os exemplos de publicações relacionadas com anticorpos "desfucosilados" ou "deficientes em fucose" incluem: US 2003/0157108; WO 2000/ 61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/ 0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Os exemplos de linhas celulares produtoras de anticorpos desfucosilados incluem células CHO Lec13 deficientes em fucosilação de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); pedido de Pat. 2003/0157108 A1, Presta, L; e WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente no Exemplo 11), e linhas celulares knockout, tais como células CHO knockout no gene da alfa-1,6-fucosiltransferase, FUT8, (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Numa concretização, o anticorpo é alterado para melhorar a sua semivida sérica. Para aumentar a semivida sérica do anticorpo, pode-se incorporar um epítopo de ligação ao receptor selvagem no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito em US 5739277, por exemplo. Como aqui se utiliza, a expressão "epítopo de ligação ao receptor selvagem" refere-se a um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4) que é responsável pelo aumento da semivida sérica *in vivo* da molécula de IgG (US 2003/0190311, US 6821505; US 6165745; US 5624821; US 5648260; US 6165745; US 5834 597).

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes possuem pelo menos um resíduo de

aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os locais de interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas estão também contempladas alterações em FR. Estão apresentadas na Tabela 1 substituições conservativas sob o título de "substituições preferidas." Se estas substituições resultam numa alteração desejável na actividade biológica, então podem ser introduzidas alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 1, ou como adicionalmente descrito adiante com referência às classes dos aminoácidos, e os produtos são rastreados.

TABELA 1

Resíduo Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são conseguidas seleccionando substituições que

diferem significativamente no seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura do esqueleto polipeptídico na área da substituição, por exemplo, na forma de uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no seu local alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com similaridades nas propriedades das suas cadeias laterais (em A.L. Lehninger, em *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) não polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares não carregados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns das cadeias laterais:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

As substituições não conservativas implicarão a troca de um membro de uma destas classes por um de outra classe. Estes resíduos substituídos também podem ser introduzidos nos locais de substituição conservativa ou, nos locais restantes (não conservados).

Um tipo de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo progenitor (e.g. um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) seleccionadas para desenvolvimento adicional terão propriedades biológicas modificadas (e.g., melhoradas) relativamente ao anticorpo progenitor a partir do qual são geradas. Uma maneira conveniente para gerar estas variantes de substituição envolve maturação em

afinidade utilizando exibição em fagos. Resumidamente, vários locais da região hipervariável (e.g. 6-7 locais) são mutados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácidos em cada local. Os anticorpos assim gerados são exibidos a partir de partículas de fagos filamentosos na forma de fusões com pelo menos parte de uma proteína de revestimento fágico (e.g., o produto do gene III de M13) empacotadas no interior de cada partícula. As variantes exibidas em fagos são então rastreadas quanto à sua actividade biológica (e.g. afinidade de ligação). De modo a identificar locais da região hipervariável candidatos para modificação, pode-se realizar mutagénese de varrimento (e.g., varrimento de alaninas) para identificar resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao抗原. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo抗原-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o抗原. Estes resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com técnicas conhecidas na especialidade, incluindo as aqui elaboradas. Uma vez geradas estas variantes, o painel de variantes é submetido a rastreio utilizando técnicas conhecidas na especialidade, incluindo as aqui descritas, e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionados para desenvolvimento adicional.

As moléculas de ácido nucleico que codificam variantes de sequências de aminoácidos do anticorpo são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na especialidade. Estes métodos incluem, mas não se lhes limitando, o isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou a preparação por mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou dirigida ao local), mutagénese por PCR e mutagénese por cassetes, de uma variante anteriormente preparada ou de uma versão não variante do anticorpo.

Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos numa região Fc dos anticorpos da invenção, desse modo gerando uma região Fc variante. A região Fc variante pode compreender uma sequência de uma região Fc humana (e.g., uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácido (e.g. uma substituição) em uma ou

mais posições de aminoácidos incluindo a de uma cisteína de charneira.

De acordo com esta descrição e com os ensinamentos da especialidade, está contemplado que em algumas concretizações, um anticorpo da invenção possa compreender uma ou mais alterações comparativamente com o anticorpo contrapartida de tipo selvagem, e.g. na região Fc. Estes anticorpos reteriam no entanto substancialmente as mesmas características necessárias para terem utilidade terapêutica em comparação com a sua contrapartida de tipo selvagem. Por exemplo, pensa-se que podem ser efectuadas determinadas alterações na região Fc que irão resultar na alteração (i.e., quer melhoria ou diminuição) de ligação a Clq e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC), e.g., como descrito em WO99/51642. Veja-se também Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente U.S. 5,648,260; Patente U.S. 5,624,821; e WO 94/29351 relativamente a outros exemplos de regiões Fc variantes. WO 00/42072 (Presta) e WO 2004/056312 (Lowman) descrevem variantes de anticorpos com ligação melhorada ou diminuída a FcR. Veja-se, também, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Os anticorpos com semividas aumentadas e ligação melhorada ao receptor de Fc (FcRn) neonatal, que é responsável pela transferência de IgG maternas ao feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), estão descritos em US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estes anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições que melhoram a ligação da região Fc a FcRn. Variantes polipeptídicas com sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e capacidade de ligação a Clq aumentada ou diminuída estão descritos na Patente US 6,194,551B1, WO99/51642. Veja-se, também, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Num aspecto, a invenção proporciona anticorpos compreendendo modificações na interface de polipéptidos de Fc compreendendo a região Fc, em que as modificações facilitam e/ou promovem a heterodimerização. Estas modificações compreendem a introdução de uma protuberância num primeiro polipéptido de Fc e uma cavidade num segundo polipéptido de Fc, em que a protuberância é posicionável na cavidade de modo a promover a complexação dos primeiro e segundo polipéptidos de Fc. Os métodos para gerar anticorpos com estas modificações são

conhecidos na especialidade, e.g., como descrito em Pat. U.S. 5,731,168.

9. Derivados de Anticorpo

Os anticorpos da presente invenção podem adicionalmente ser modificados para conter porções não proteináceas adicionais que são conhecidas na especialidade e estão prontamente disponíveis. Preferivelmente, as porções adequadas para derivatização do anticorpo são polímeros solúveis em água. Os exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não se lhes limitando, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, poli(álcool vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (quer homopolímeros quer copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli(n-vinilpirrolidona)polietilenoglicol, homopolímeros de propropilenoglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis polioxietilados (e.g., glicerol), poli(álcool vinílico), e suas misturas. O polietilenoglicolpropionaldeído pode ter vantagens no fabrico devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se estiver mais do que um polímero ligado, estes podem ser moléculas iguais ou diferentes. Em geral, o número e/ou o tipo de polímeros utilizados para derivatização podem ser determinados com base em considerações incluindo, mas não se lhes limitando, as propriedades ou funções particulares do anticorpo a melhorar, se o derivado de anticorpo será utilizado numa terapia sob condições definidas, etc.

Em outra concretização, são proporcionados conjugados de um anticorpo e uma porção não proteinácea que podem ser selectivamente aquecidos por exposição a radiação. Numa concretização, a porção não proteinácea é um nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 11600-11605 (2005)). A radiação pode ser de qualquer comprimento de onda, e inclui, mas não se lhes limita, comprimentos de onda que não prejudicam células ordinárias, mas que aquecem a porção não proteinácea a uma temperatura a que as células proximais da porção não proteinácea do anticorpo são mortas.

Certos Métodos de Preparação de Anticorpos**1. Certos Métodos à Base de Hibridomas**

Os anticorpos anti-STEAP-1 monoclonais da invenção podem ser preparados utilizando o método do hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (Patente U.S. 4,816,567).

No método do hibridoma, um rato ou outro animal hospedeiro adequado, tal como um hamster, é imunizado para eliciar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se irão ligar especificamente à proteína utilizada para a imunização. Os anticorpos contra STEAP-1 geralmente são criados em animais por múltiplas injecções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) de STEAP-1 e um adjuvante. A STEAP-1 pode ser preparada utilizando métodos bem conhecidos na especialidade, alguns dos quais estão aqui adicionalmente descritos. Por exemplo, a STEAP-1 pode ser produzida recombinantemente. Numa concretização, animais são imunizados com um derivado de STEAP-1 que contém uma porção extracelular de STEAP-1 fundida à porção Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Numa concretização, os animais são imunizados com uma proteína de fusão STEAP-1-IgG1. Numa concretização, os animais são imunizados com derivados imunogénicos de STEAP-1 numa solução com monofosforil-lípido A (MPL)/ dicitrionomicolato de trealose (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), e a solução é injectada intradermicamente em múltiplos locais. Duas semanas mais tarde os animais recebem reforços. Sete a catorze dias mais tarde os animais são sangrados, e o soro é testado quanto ao título anti-STEAP-1. Os animais recebem reforços até atingirem patamares de título.

Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são depois fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp, 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são rastreadas e crescidas num meio de cultura adequado, e.g., um meio que contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma progenitoras, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma progenitoras não possuem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Em determinadas concretizações, as células de mieloma são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção estável e de nível elevado de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas, e são sensíveis a um meio tal como o meio HAT. As células de mieloma exemplificativas incluem, mas não se lhes limitando, linhas de mieloma murino, tais como as derivadas dos tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EUA, e as células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano foram também descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

O meio de cultura em que as células de hibridoma são crescidas é testado quanto à produção de anticorpos monoclonais que se ligam a STEAP-1. Preferivelmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio imunoabsorvente com enzimas ligadas (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através da análise Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados por

procedimentos de diluição limitante e crescidos por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp, 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Em adição, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* na forma de tumores ascíticos num animal. Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, do fluido ascítico ou do soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, cromatografia em hidroxilapatite, proteína A-Sepharose, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

2. Certos Métodos de Rastreio de Bibliotecas

Os anticorpos anti-STEAP-1 da invenção podem ser preparados utilizando bibliotecas combinatórias para o rastreio de anticorpos com a actividade ou actividades desejadas. Por exemplo, são conhecidos na especialidade uma variedade de métodos para a geração de bibliotecas de exibição em fagos e rastreio destas bibliotecas quanto a anticorpos possuindo as características de ligação desejadas. Estes métodos estão descritos genericamente em Hoogenboom *et al.* (2001) em *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ), e em determinadas concretizações, em Lee *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

Em princípio, clones de anticorpos sintéticos são seleccionados por rastreio de bibliotecas de fagos contendo fagos que exibem vários fragmentos de regiões variáveis de anticorpos (Fv) fundidos com a proteína de revestimento fágico. Estas bibliotecas de fagos são seleccionadas por cromatografia de afinidade contra o antigénio desejado. Os clones que expressam fragmentos de Fv capazes de se ligar ao antigénio desejado são adsorvidos no antigénio e assim são separados dos clones que não se ligam na biblioteca. Os clones que se ligam são então eluídos do antigénio, e podem ser adicionalmente enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição com o antigénio. Qualquer dos anticorpos anti-STEAP-1 da invenção pode ser obtido desenhandando um procedimento de rastreio adequado para o antigénio para seleccionar o clone fágico de interesse seguido por construção de um clone de anticorpo anti-STEAP-1 de comprimento completo utilizando as sequências de Fv do clone

fágico de interesse e as sequências adequadas da região constante (Fc) descritas em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publicação 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Em determinadas concretizações, o domínio de ligação ao抗igénio de um anticorpo é formado a partir de duas regiões variáveis (V) de cerca de 110 aminoácidos, uma de cada das cadeias leve (VL) e pesada (VH), que apresentam ambas três voltas hipervariáveis (HVR) ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). Os domínios variáveis podem ser exibidos funcionalmente sobre fagos, quer na forma de fragmentos Fv de cadeia única (scFv), em que VH e VL estão covalentemente ligadas através de um péptido curto, flexível, quer na forma de fragmentos Fab, em que estão fundidos com um domínio constante e interactuam não covalentemente, como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como aqui se utilizam, clones fágicos que codificam scFv e clones fágicos que codificam Fab são colectivamente referidos como "clones fágicos de Fv" ou "clones de Fv".

Repertórios de genes de VH e VL podem ser clonados separadamente por reacção em cadeia pela polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas de fagos, que podem depois ser pesquisadas quanto a clones de ligação ao抗igénio como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As bibliotecas de fontes imunizadas proporcionam anticorpos de elevada afinidade contra o imunogénio sem a necessidade de construir híbridomas. Alternativamente, o repertório naïve pode ser clonado para proporcionar uma fonte única de anticorpos humanos contra uma ampla gama de抗igénios não próprios e também próprios sem qualquer imunização como descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, podem também ser preparadas bibliotecas naïve sinteticamente por clonagem dos segmentos de genes V não rearranjados a partir de células estaminais, e utilizando iniciadores de PCR contendo sequências aleatórias para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para realizar o rearranjo *in vitro* como descrito por Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Em determinadas concretizações, utilizam-se fagos filamentosos para exibir fragmentos de anticorpo por fusão com a proteína do revestimento menor pIII. Os fragmentos de anticorpo podem ser exibidos na forma de fragmentos Fv de cadeia única, em que os domínios VH e VL estão ligados na mesma cadeia polipeptídica através de um espaçador polipeptídico flexível, e.g. como descrito por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou na forma de fragmentos Fab, em que uma cadeia está fundida com pIII e a outra é segregada para o periplasma da célula hospedeira bacteriana onde há a montagem de uma estrutura Fab-proteína do revestimento que fica exibida sobre a superfície do fago por deslocamento de algumas das proteínas do revestimento do tipo selvagem, e.g. como descrito em Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Em geral, os ácidos nucleicos que codificam os fragmentos de genes do anticorpo são obtidos a partir de células imunitárias colhidas de seres humanos ou animais. Se for desejada uma biblioteca desviada a favor de clones anti-STEAP-1, o indivíduo é imunizado com STEAP-1 para gerar uma resposta de anticorpos, e células do baço e/ou células B circulantes que não linfócitos do sangue periférico (PBL) são recuperadas para a construção da biblioteca. Numa concretização preferida, uma biblioteca de fragmentos de genes do anticorpo humano desviada a favor de clones anti-STEAP-1 é obtida gerando uma resposta de anticorpos anti-STEAP-1 em ratinhos transgênicos portadores de um arranjo (array) de genes de imunoglobulina humana funcional (e sem um sistema de produção de anticorpos endógenos funcional) de modo que a imunização com STEAP-1 dá origem a células B produtoras de anticorpos contra STEAP-1 humanas. A geração de ratinhos transgênicos produtores de anticorpos humanos é descrita adiante.

O enriquecimento adicional em populações de células reactivas anti-STEAP-1 pode ser obtido utilizando um procedimento de rastreio adequado para isolar células B que expressam anticorpo específico para STEAP-1 ligado à membrana, e.g., por separação celular utilizando cromatografia de afinidade com STEAP-1 ou adsorção de células a STEAP-1 marcada com fluorocromos seguida de separação de células activada em fluxo ("flow-activated cell sorting") (FACS).

Alternativamente, a utilização de células do baço e/ou de células B ou outros PBL de um dador não imunizado proporciona uma melhor representação do possível repertório de anticorpos, e também permite a construção de uma biblioteca de anticorpos utilizando qualquer espécie animal (humana ou não humana) em que a STEAP-1 não é antigénica. Para bibliotecas que incorporam a construção génica do anticorpo *in vitro*, células estaminais são colhidas do indivíduo para proporcionar ácidos nucleicos que codificam segmentos de genes de anticorpos não rearranjados. As células imunitárias de interesse podem ser obtidas a partir de uma variedade de espécies animais, tais como humanas, de ratinho, de rato, de lagomorfos, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina e avícola, etc.

Ácidos nucleicos que codificam segmentos génicos variáveis de anticorpo (incluindo segmentos VH e VL) são recuperados das células de interesse e amplificados. No caso de bibliotecas de genes de VH e VL rearranjados, o ADN desejado pode ser obtido por isolamento de ADN genómico ou ARNm de linfócitos seguido por reacção em cadeia pela polimerase (PCR) com iniciadores correspondentes às extremidades 5' e 3' dos genes de VH e VL rearranjados como descrito em Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando desse modo repertórios de genes V diversos para expressão. Os genes V podem ser amplificados a partir do ADNc e ADN genómico, com retro-iniciadores na extremidade 5' do exão que codifica o domínio V maduro e iniciadores inversos baseados no interior do segmento J como descrito em Orlandi *et al.* (1989) e em Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Contudo, para a amplificação a partir de ADNc, os retro-iniciadores podem também ser baseados no exão de comando como descrito em Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), e iniciadores directos no interior da região constante como descrito em Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, pode ser incorporada degenerescência nos iniciadores como descrito em Orlandi *et al.* (1989) ou Sastry *et al.* (1989). Em determinadas concretizações, a diversidade da biblioteca é maximizada utilizando iniciadores de PCR direcionados para cada família de genes V de modo a amplificar todos os arranjos de VH e VL disponíveis presentes na amostra de ácido nucleico de células imunitárias, e.g. como descrito no método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) ou

como descrito no método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para a clonagem do ADN amplificado nos vectores de expressão, podem ser introduzidos locais de restrição raros no interior do iniciador de PCR como marcador numa extremidade como descrito em Orlandi *et al.* (1989), ou por amplificação adicional por PCR com um iniciador marcado como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Os repertórios de genes V sinteticamente rearranjados podem ser derivados *in vitro* de segmentos de genes V. A maioria dos segmentos de genes VH humanos foram clonados e sequenciados (reportado em Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), e mapeados (reportado em Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estes segmentos clonados (incluindo todas as conformações principais da volta H1 e H2) podem ser utilizados para gerar repertórios de genes VH diversos com iniciadores de PCR que codificam voltas H3 de diversas sequências e comprimentos como descrito em Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Os repertórios de VH podem também ser preparados com toda a diversidade de sequências focada numa volta H3 longa de um único comprimento como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Segmentos de V e V humanos foram clonados e sequenciados (reportado em Williams e Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) e podem ser utilizados para preparar repertórios de cadeias leves sintéticos. Os repertórios sintéticos de genes V, baseados numa gama de voltas VH e VL, e comprimentos L3 e H3, irão codificar anticorpos de considerável diversidade estrutural. Após amplificação dos ADN que codificam os genes V, segmentos de genes V da linha germinal podem ser rearranjados *in vitro* de acordo com os métodos de Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Os repertórios de fragmentos de anticorpo podem ser construídos combinando repertórios de genes VH e VL juntos de várias maneiras. Cada repertório pode ser criado em vectores diferentes, e os vectores podem ser recombinados *in vitro*, *e.g.*, como descrito em Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), ou *in vivo* por infecção combinatória, *e.g.*, o sistema loxP descrito em Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). A abordagem de recombinação *in vivo* explora a natureza de duas cadeias dos fragmentos Fab para ultrapassar o limite na dimensão

da biblioteca imposto pela eficiência da transformação de *E. coli*. Repertórios de VH e VL naïve são clonados separadamente, um num fagemídeo e o outro num vetor fágico. As duas bibliotecas são então combinadas por infecção fágica de bactérias contendo fagemídeo de modo que cada célula contém uma combinação diferente e a dimensão da biblioteca está limitada apenas pelo número de células presentes (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vectores contêm sinais de recombinação *in vivo* de modo que os genes VH e VL são recombinados num único replicão e são co-empacotados em viriões fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionam grandes números de anticorpos diversos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

Alternativamente, os repertórios podem ser clonados sequencialmente no mesmo vector, e.g. como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou montados em conjunto por PCR e depois clonados, e.g. como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). A montagem por PCR pode também ser utilizada para unir os ADN de VH e VL com ADN que codifica um espaçador peptídico flexível para formar repertórios de Fv de cadeia única (scFv). Em ainda outra técnica é utilizada "montagem por PCR celular" para combinar genes de VH e VL no interior de linfócitos por PCR e depois repertórios de clone de genes ligados como descrito em Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Os anticorpos produzidos por bibliotecas naïve (quer naturais ou sintéticas) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M $^{-1}$), mas pode também ser imitada a maturação de afinidade *in vitro* construindo e re-selecciónando a partir de bibliotecas secundárias como descrito em Winter *et al.* (1994), *supra*. Por exemplo, pode ser introduzida uma mutação aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerase propensa a erros (reportada em Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) no método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) ou no método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, pode ser realizada maturação de afinidade por mutação aleatória de uma ou mais CDR, e.g. utilizando PCR com iniciadores portadores de sequências aleatórias que se estendem pelas CDR de interesse, em clones de Fv individuais seleccionados e rastreio quanto a clones de mais elevada afinidade. WO 9607754 (publicado em 14 de Março de 1996)

descreve um método para indução de mutagénese numa região determinante de complementaridade de uma cadeia leve de imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeia leve. Outra abordagem eficaz consiste em recombinar os domínios VH ou VL seleccionados por exibição em fagos com repertórios de variantes de domínio V de ocorrência natural obtidas de dadores não imunizados e rastrear quanto a maior afinidade em vários ciclos de re-baralhamento de cadeias como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades de cerca de 10^{-9} M ou menos.

O rastreio das bibliotecas pode ser realizado através de várias técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, a STEAP-1 pode ser utilizada para revestir os poços de placas de adsorção, expressa em células hospedeiras afixadas nas placas de adsorção ou utilizadas em selecção de células, ou conjugadas com biotina para captura com contas revestidas de estreptavidina, ou utilizadas em qualquer outro método para selecção de bibliotecas de exibição em fagos.

As amostras de bibliotecas de fagos são colocadas em contacto com STEAP-1 imobilizada sob condições adequadas para a ligação de pelo menos uma porção das partículas fágicas ao adsorvente. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iónica e temperatura, são seleccionadas para imitar as condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e depois eluídos por ácido, e.g. como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou por álcali, e.g. como descrito em Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou por competição com antígeno STEAP-1, e.g. num procedimento similar ao método de competição com antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Os fagos podem ser enriquecidos 20-1000 vezes num único ciclo de selecção. Adicionalmente, os fagos enriquecidos podem ser crescidos em cultura bacteriana e submetidos a ciclos adicionais de selecção.

A eficiência da selecção depende de muitos factores, incluindo a cinética da dissociação durante a lavagem, e se múltiplos fragmentos de anticorpo num único fago podem simultaneamente estar envolvidos com o antígeno. Os anticorpos com cinética de dissociação rápida (e fracas afinidades de

ligação) podem ser retidos utilizando lavagens curtas, exibição multivalente em fagos e elevada densidade de revestimento de抗igénio em fase sólida. A elevada densidade não apenas estabiliza o fago através de interacções multivalentes, mas também favorece a re-ligaçāo do fago que se dissociou. A selecção de anticorpos com cinética de dissociação lenta (e boas afinidades de ligação) pode ser promovida por utilização de lavagens longas e exibição monovalente em fagos como descrito em Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e em WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento de抗igénio como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

É possível seleccionar entre anticorpos fágicos de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que diferem ligeiramente, para com STEAP-1. Contudo, a mutação aleatória de um anticorpo seleccionado (e.g. como realizado em algumas técnicas de maturação de afinidade) dá provavelmente origem a muitos mutantes, a maioria ligando-se ao抗igénio, e poucos com maior afinidade. Com STEAP-1 limitante, pode haver competição com fagos de elevada afinidade raros. Para reter todos os mutantes de maior afinidade, os fagos podem ser incubados com excesso de STEAP-1 biotinilada, mas com a STEAP-1 biotinilada numa concentração de menor molaridade do que a constante de afinidade molar alvo para STEAP-1. Os fagos com ligação de elevada afinidade podem então ser capturados por contas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. Esta "captura de equilíbrio" permite que os anticorpos sejam seleccionados de acordo com as suas afinidades de ligação, com sensibilidade que permite o isolamento de clones mutantes com afinidade apenas duas vezes superior a partir de um grande excesso de fagos com menor afinidade. As condições utilizadas na lavagem dos fagos ligados a uma fase sólida podem também ser manipuladas para discriminá-los com base na cinética da dissociação.

Os clones anti-STAP-1 podem ser seleccionados com base na actividade. Em determinadas concretizações, a invenção proporciona anticorpos anti-STAP-1 que se ligam a células vivas que expressam naturalmente STAP-1. Numa concretização, a invenção proporciona anticorpos anti-STAP-1 que bloqueiam a ligação entre um ligando STAP-1 e STAP-1, mas não bloqueiam a ligação entre um ligando STAP-1 e uma segunda proteína. Os

clones de Fv correspondentes a estes anticorpos anti-STEAP-1 podem ser seleccionados por (1) isolamento de clones anti-STEAP-1 a partir de uma biblioteca de fagos como descrito acima, e opcionalmente amplificação da população isolada de clones fágicos por crescimento da população num hospedeiro bacteriano adequado; (2) selecção de STEAP-1 e uma segunda proteína contra a qual é desejada actividade bloqueante e não bloqueante, respectivamente; (3) adsorção dos clones fágicos anti-STEAP-1 a STEAP-1 imobilizada; (4) utilização de um excesso da segunda proteína para eluir quaisquer clones indesejados que reconhecem determinantes de ligação a STEAP-1 que se sobreponem a, ou são partilhados por, os determinantes de ligação da segunda proteína; e (5) eluição dos clones que permanecem adsorvidos após o passo (4). Opcionalmente, os clones com as propriedades bloqueantes/não bloqueantes desejadas podem ser adicionalmente enriquecidos por repetição dos procedimentos de selecção aqui descritos, uma ou mais vezes.

O ADN que codifica anticorpos monoclonais derivados de hibridomas ou clones de Fv por exibição em fagos da invenção é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g. utilizando iniciadores oligonucleotídicos desenhados para amplificar especificamente as regiões de codificação da cadeia pesada e leve de interesse a partir de um hibridoma ou um molde de ADN fágico). Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína imunoglobulina, para obter a síntese dos anticorpos monoclonais desejados nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre a expressão recombinante em bactérias de ADN de codificação de anticorpos incluem Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

O ADN que codifica os clones de Fv da invenção pode ser combinado com sequências de ADN conhecidas que codificam regiões constantes da cadeia pesada e/ou da cadeia leve (e.g. podem ser obtidas sequências de ADN apropriadas de Kabat et al., supra) para formar clones que codificam cadeias pesadas e/ou leves de comprimento completo ou parcial. Será notado que podem ser

utilizadas regiões constantes de qualquer isotipo para este fim, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que estas regiões constantes podem ser obtidas de qualquer espécie humana ou animal. Um clone de Fv derivado do ADN do domínio variável de uma espécie animal (tal como o ser humano) e depois fundido com o ADN da região constante de outra espécie animal para formar sequência(s) de codificação para cadeias pesadas e/ou cadeias leves "híbridas" de comprimento completo está incluído na definição de anticorpo "quimérico" e "híbrido" como aqui se utiliza. Em determinadas concretizações, um clone de Fv derivado de ADN variável humano é fundido com ADN da região constante humana para formar sequência(s) de codificação para cadeias pesadas e/ou leves de comprimento completo ou parcial humanas.

O ADN que codifica anticorpo anti-STEAP-1 derivado de um hibridoma da invenção pode também ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação para domínios constantes da cadeia pesada e leve humanos no lugar de sequências homólogas murinas derivadas do clone do hibridoma (e.g. como no método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). O ADN que codifica um anticorpo ou fragmento derivado de hibridomas ou de clones de Fv pode ser adicionalmente modificado por união covalente da sequência de codificação da imunoglobulina com a totalidade ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo que não de imunoglobulina. Desta maneira, são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que possuem a especificidade de ligação dos anticorpos derivados de clones de Fv ou de hibridomas da invenção.

3. Vectores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes

Para a produção recombinante de um anticorpo da invenção, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido num vector replicável para posterior clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN que codifica o anticorpo é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos). Muitos vectores estão disponíveis. A escolha do vector depende em parte da célula hospedeira a utilizar. Geralmente, as células hospedeiras são de origem

procariota ou eucariota (geralmente de mamífero). Será notado que regiões constantes de qualquer isotipo podem ser utilizadas para este fim, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e que estas regiões constantes podem ser obtidas a partir de qualquer espécie humana ou animal.

Geração de anticorpos utilizando células hospedeiras procariotas:

Construção de Vectores

Sequências de polinucleótidos que codificam componentes polipeptídicas do antícorpo da invenção podem ser obtidas utilizando técnicas recombinantes padrão. As sequências de polinucleótidos desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de antícorpo tais como células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleótidos podem ser sintetizados utilizando sintetizadores de nucleótidos ou técnicas de PCR. Uma vez obtidas, as sequências que codificam os polipéptidos são inseridas num vetor recombinante capaz de replicar e expressar polinucleótidos heterólogos em hospedeiros procariotas. Muitos vectores que estão disponíveis e são conhecidos na especialidade podem ser utilizados para a finalidade da presente invenção. A selecção de um vetor apropriado irá depender principalmente da dimensão dos ácidos nucleicos a inserir no vetor e da célula hospedeira particular a transformar com o vetor. Cada vetor contém várias componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão de polinucleótido heterólogo, ou ambas) e da sua compatibilidade com a célula hospedeira particular em que reside. As componentes do vetor geralmente incluem, mas não se lhes limitando: uma origem de replicação, um gene marcador de selecção, um promotor, um local de ligação ao ribossoma (RBS), uma sequência de sinal, a inserção de ácido nucleico heterólogo e uma sequência de terminação da transcrição.

Em geral, vectores plasmídicos contendo replicões e sequências de controlo que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira, são utilizados em ligação a esses hospedeiros. O vetor é vulgarmente portador de um local de replicação, assim como de sequências marcadoras que são capazes de proporcionar a selecção fenotípica nas células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de

E. coli. O pBR322 contém genes que codificam resistência a ampicilina (Amp) e a tetraciclina (Tet) e assim proporcionam um meio fácil para a identificação das células transformadas. O pBR322, os seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófagos, podem também conter, ou ser modificados para conter, promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para expressão de proteínas endógenas. Os exemplos de derivados de pBR322 utilizados para a expressão de anticorpos particulares estão descritos com detalhes em Carter *et al.*, Patente U.S. 5,648,237.

Em adição, vectores fágicos contendo replicões e sequências de controlo que são compatíveis com o microorganismo hospedeiro, podem ser utilizados como vectores de transformação em ligação a estes hospedeiros. Por exemplo, os bacteriófagos como GEM.TM.-11 podem ser utilizados na preparação de um vector recombinante que pode ser utilizado para transformar células hospedeiras susceptíveis tais como *E. coli* LE392.

O vector de expressão da invenção pode compreender dois ou mais pares promotor-cistrão, que codificam cada uma das componentes polipeptídicas. Um promotor é uma sequência reguladora não traduzida localizada a montante (5') de um cistrão que modula a sua expressão. Os promotores procariotas tipicamente caem em duas classes, indutíveis e constitutivos. O promotor indutível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do cistrão sob o seu controlo em resposta a alterações nas condições de cultura, e.g. a presença ou ausência de um nutriente ou uma alteração na temperatura.

São bem conhecidos um grande número de promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais. O promotor seleccionado pode estar operativamente ligado a ADN de cistrões que codificam a cadeia leve ou pesada por remoção do promotor a partir do ADN fonte através de digestão por enzimas de restrição e inserção da sequência promotora isolada no vector da invenção. Podem ser utilizados tanto a sequência promotora nativa como muitos promotores heterólogos para dirigir a amplificação e/ou a expressão dos genes alvo. Em algumas concretizações são utilizados promotores heterólogos, pois geralmente permitem maior transcrição e

superiores rendimentos de gene alvo expresso em comparação com o promotor do polipeptídeo alvo nativo.

Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem o promotor PhoA, os sistemas promotores da -galactamase e da lactose, um sistema promotor do triptofano (trp) e promotores híbridos tais como o promotor tac ou o trc. Contudo, são também adequados outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores bacterianos ou fágicos conhecidos). As suas sequências de nucleótidos foram publicadas, desse modo permitindo a um trabalhador especializado ligá-los operativamente a cistões que codificam as cadeias leves e pesadas alvo (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) utilizando ligantes ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários.

Num aspecto da invenção, cada cistão no interior do vector recombinante comprehende uma componente sequência de sinal de secreção que dirige a translocação dos polipeptídos expressos através da membrana. Em geral, a sequência de sinal pode ser uma componente do vector, ou pode ser uma parte do ADN do polipeptídeo alvo que é inserido no vector. A sequência de sinal seleccionada para os fins da presente invenção deverá ser uma sequência que é reconhecida e processada (*i.e.* clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariotas que não reconhecem nem processam as sequências de sinal nativas aos polipeptídos heterólogos, a sequência de sinal é substituída por uma sequência de sinal procariota seleccionada, por exemplo, do grupo que consiste nos comandos da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina II estável ao calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Numa concretização da invenção, as sequências de sinal utilizadas em ambos os cistões do sistema de expressão são sequências de sinal STII ou suas variantes.

Noutro aspecto, a produção das imunoglobulinas de acordo com a invenção pode ocorrer no citoplasma da célula hospedeira, e portanto não requer a presença de sequências de sinal de secreção no interior de cada cistão. A esse respeito, as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina são expressas, dobradas e montadas para formar imunoglobulinas funcionais no interior do citoplasma. Certas estirpes hospedeiras (*e.g.*, as

estirpes de *E. coli* *trxB*-) proporcionam condições no citoplasma que são favoráveis à formação de ligações dissulfureto, desse modo permitindo as correctas dobragem e montagem de subunidades de proteína expressas. Proba e Pluckthun, *Gene*, 159:203 (1995).

Os anticorpos da invenção podem também ser produzidos utilizando um sistema de expressão em que a razão quantitativa de componentes polipeptídicas expressas pode ser modulada de modo a maximizar o rendimento de anticorpos da invenção segregados e correctamente montados. Esta modulação é realizada, pelo menos em parte, por modulação simultânea das forças de tradução para as componentes polipeptídicas.

Uma técnica para a modulação das forças de tradução é divulgada em Simmons et al., Pat. U.S. 5,840,523. Esta utiliza variantes da região de iniciação da tradução (TIR) no interior de um cistrão. Para uma determinada TIR, pode ser criada uma série de variantes de sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico com uma gama de forças de tradução, desse modo proporcionando um meio conveniente através do qual ajustar este factor para o nível de expressão desejado da cadeia específica. As variantes de TIR podem ser geradas por técnicas convencionais de mutagénese que resultam em alterações de codões que podem alterar a sequência de aminoácidos. Em determinadas concretizações, as alterações na sequência de nucleótidos são silenciosas. As alterações na TIR podem incluir, por exemplo, alterações no número ou no espaçamento de sequências de Shine-Dalgarno, juntamente com alterações na sequência de sinal. Um método para gerar sequências de sinal mutantes é a geração de um "banco de codões" no início de uma sequência de codificação que não altera a sequência de aminoácidos da sequência de sinal (*i.e.*, as alterações são silenciosas). Isto pode ser realizado alterando a terceira posição de nucleótido de cada codão; adicionalmente, alguns aminoácidos, tais como leucina, serina e arginina, possuem múltiplas primeira e segunda posições que podem adicionar complexidade à preparação do banco. Este método de mutagénese está descrito com detalhes em Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Numa concretização, é gerado um conjunto de vectores com uma gama de forças de TIR para cada um dos seus cistrões. Este conjunto limitado proporciona uma comparação de níveis de

expressão de cada cadeia assim como do rendimento dos produtos de anticorpo desejados sob várias combinações de força de TIR. As forças de TIR podem ser determinadas por quantificação do nível de expressão de um gene repórter como descrito com detalhes em Simmons et al. Pat. U.S. 5,840,523. Com base na comparação de forces de tradução, são seleccionadas as TIR individuais desejadas para combinar nas construções do vector de expressão da invenção.

As células hospedeiras procariotas adequadas para expressão de anticorpos da invenção incluem *Archaeabacteria* e *Eubacteria*, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Os exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (e.g., *E. coli*), *Bacilli* (e.g., *B. subtilis*), *Enterobacteriia*, espécies de *Pseudomonas* (e.g., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* ou *Paracoccus*. Numa concretização, são utilizadas células Gram-negativas. Numa concretização, são utilizadas células de *E. coli* como hospedeiros para a invenção. Os exemplos de estirpes de *E. coli* incluem a estirpe W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; N.º de Depósito na ATCC 27,325) e seus derivados, incluindo a estirpe 33D3 possuindo o genótipo W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kanR (Pat. U.S. 5,639,635). Outras estirpes e seus derivados, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) são também adequadas. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes. Os métodos para construção de derivados de quaisquer das bactérias acima mencionadas possuindo genótipos definidos são conhecidos na especialidade e estão descritos, por exemplo, em Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). É geralmente necessário seleccionar a bactéria apropriada tendo em consideração a replicabilidade do replicão nas células de uma bactéria. Por exemplo, *E. coli*, espécies de *Serratia* ou *Salmonella* podem ser adequadamente utilizadas como hospedeiro quando são utilizados plasmídeos bem conhecidos como pBR322, pBR325, pACYC 177 ou pKN410 para fornecer o replicão. Tipicamente, a célula hospedeira deverá segregar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores de protease

adicionais podem ser desejavelmente incorporados na cultura celular.

Produção de Anticorpos

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão acima descritos e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para induzir promotores, seleccionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

Transformação significa a introdução de ADN no hospedeiro procariota de modo a que o ADN seja replicável, quer na forma de um elemento extracromossómico quer como integrante cromossómico. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio é geralmente utilizado para células bacterianas que contêm barreiras de parede celular substanciais. Outro método para a transformação emprega polietilenoglicol/DMSO. Ainda outra técnica utilizada é a electroporação.

As células procariotas utilizadas para produzir os polipéptidos da invenção são crescidas em meios conhecidos na especialidade e adequados para a cultura das células hospedeiras seleccionadas. Os exemplos de meios adequados incluem caldo lúria (LB) mais os suplementos de nutrientes necessários. Em algumas concretizações, os meios também contêm um agente de selecção, escolhido com base na construção do vector de expressão, para permitir o crescimento selectivo de células procariotas contendo o vector de expressão. Por exemplo, adiciona-se ampicilina aos meios para o crescimento de células que expressam genes de resistência a ampicilina.

Quaisquer suplementos necessários para além de fontes de carbono, azoto e fosfato inorgânico podem também ser incluídos nas concentrações apropriadas introduzidos singularmente ou na forma de uma mistura com outro suplemento ou meio tal como uma fonte de azoto complexa. Opcionalmente o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores seleccionados do grupo que consiste em glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreitol.

As células hospedeiras procariotas são cultivadas a temperaturas adequadas. Em determinadas concretizações, para o crescimento de *E. coli*, as temperaturas de crescimento variam de cerca de 20°C a cerca de 39°C; de cerca de 25°C a cerca de 37°C; ou cerca de 30°C. O pH do meio pode ser qualquer pH variando de cerca de 5 a cerca de 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Em determinadas concretizações, para *E. coli*, o pH é de cerca de 6,8 a cerca de 7,4, ou de cerca de 7,0.

Se for utilizado um promotor indutível no vector de expressão da invenção, a expressão da proteína é induzida sob condições adequadas para a activação do promotor. Num aspecto da invenção, são utilizados promotores PhoA para controlar a transcrição dos polipéptidos. Desse modo, as células hospedeiras transformadas são cultivadas num meio com limitação por fosfato para a indução. Em determinadas concretizações, o meio com limitação por fosfato é o meio C.R.A.P. (veja-se, e.g., Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Podem ser utilizados uma variedade de outros indutores, de acordo com a construção de vector empregue, como é conhecido na especialidade.

Numa concretização, os polipéptidos expressos são segregados para, e recuperados de, o periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteínas envolve tipicamente a ruptura do microorganismo, geralmente por meios como choque osmótico, tratamento com ultrassons ou lise. Após a ruptura das células, os detritos celulares ou células completas podem ser removidos por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser adicionalmente purificadas, por exemplo, por cromatografia em resina afinidade. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para os meios de cultura e aí isoladas. As células podem ser removidas da cultura e sendo o sobrenadante da cultura filtrado e concentrado para purificação adicional das proteínas produzidas. Os polipéptidos expressos podem ser adicionalmente isolados e identificados utilizando métodos vulgarmente conhecidos tais como electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio *Western blot*.

Num aspecto da invenção, a produção de anticorpos é conduzida em grande quantidade através de um processo de fermentação. Estão disponíveis vários procedimentos fermentação em descontínuo com alimentação em larga escala para a produção de proteínas recombinantes. As fermentações em larga escala têm pelo menos 1000 litros de capacidade, e em determinadas concretizações, cerca de 1000 a 100 000 litros de capacidade. Estes fermentadores utilizam propulsores agitadores para distribuir o oxigénio e os nutrientes, especialmente glucose (a fonte preferida de carbono/energia). Fermentação em pequena escala refere-se geralmente a fermentação num fermentador que não tem mais do que aproximadamente 100 litros de capacidade volumétrica, e pode variar de cerca de 1 litro a cerca de 100 litros.

Num processo de fermentação, a indução da expressão de proteína é tipicamente iniciada após as células terem crescido sob condições adequadas até uma densidade desejada, e.g., uma D₀₅₅₀ de cerca de 180-220, estágio em que as células estão na fase estacionária precoce. Podem ser utilizados uma variedade de indutores, de acordo com as construções de vector empregue, como é conhecido na especialidade e está descrito acima. As células podem ser crescidas durante períodos mais curtos antes da indução. As células são usualmente induzidas durante cerca de 12-50 horas, embora possa ser utilizado um tempo de indução mais longo ou mais curto.

Para melhorar o rendimento de produção e a qualidade dos polipéptidos da invenção, podem ser modificadas várias condições da fermentação. Por exemplo, para melhorar a montagem e dobragem correctas dos polipéptidos de antícorpo segregados, podem ser utilizados vectores adicionais que sobre-expressam proteínas chaperone, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e ou DsbG) ou FkpA (uma peptidilprolil-*cis, trans*-isomerase com actividade de chaperone) para co-transformar células hospedeiras procariotas. Foi demonstrado que as proteínas chaperone facilitam a correcta dobragem e a solubilidade de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente U.S. 6,083,715; Georgiou et al., Patente U.S. 6,027,888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.*

275:17100-17105; Ramm e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente as que são proteoliticamente sensíveis), certas estirpes hospedeiras deficientes em enzimas proteolíticas podem ser utilizadas na presente invenção. Por exemplo, estirpes de células hospedeiras podem ser modificadas para efectuar mutação(ões) genética(s) nos genes que codificam proteases bacterianas conhecidas tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e suas combinações. Algumas estirpes de *E. coli* deficientes em proteases estão disponíveis e estão descritas em, por exemplo, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., Patente U.S. 5,264,365; Georgiou et al., Patente U.S. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Numa concretização, estirpes de *E. coli* deficientes em enzimas proteolíticas e transformadas com plasmídeos que sobre-expressam uma ou mais proteínas chaperone são utilizadas como células hospedeiras no sistema de expressão da invenção.

Purificação de Anticorpos

Numa concretização, a proteína do antícorpo aqui produzida é adicionalmente purificada para obter preparações que são substancialmente homogéneas para ensaios e utilizações adicionais. Podem ser empregues métodos padrão de purificação de proteínas conhecidos na especialidade. Os procedimentos que se seguem são exemplificativos de procedimentos de purificação adequados: fraccionamento em colunas de imunoafinidade ou permuta iônica, precipitação em etanol, HPLC de fase inversa, cromatografia sobre sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE, cromatofragem, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amónio e filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75.

Num aspecto, Proteína A immobilizada numa fase sólida é utilizada para purificação por imunoafinidade dos produtos de antícorpo da invenção. A proteína A é uma proteína da parede celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se liga com elevada afinidade à região Fc de anticorpos. Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. A fase sólida a que a Proteína

A é imobilizada pode ser uma coluna compreendendo uma superfície de vidro ou de sílica, ou uma coluna de vidro de poros controlados ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna é revestida com um reagente, tal como glicerol, para possivelmente prevenir a aderência não específica de contaminantes.

Como primeiro passo de purificação, uma preparação derivada da cultura celular como descrito acima pode ser aplicada a uma Proteína A imobilizada em fase sólida para permitir a ligação específica do anticorpo de interesse à Proteína A. A fase sólida será então lavada para remover contaminantes ligados não especificamente à fase sólida. Finalmente, o anticorpo de interesse é recuperado da fase sólida por eluição.

Geração de anticorpos utilizando células hospedeiras eucariotas:

Um vector para utilização numa célula hospedeira eucariota geralmente inclui uma ou mais das seguintes componentes não limitantes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição.

Componente sequência de sinal

Um vector para utilização numa célula hospedeira eucariota pode também conter uma sequência de sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína madura ou do polipéptido de interesse. A sequência de sinal heteróloga seleccionada pode ser uma que é reconhecida e processada (*i.e.*, clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Na expressão em células de mamífero, estão disponíveis sequências de sinal de mamífero assim como comandos de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes *simplex*. O ADN para esta região precursora é ligado em enquadramento de leitura a ADN que codifica o anticorpo.

Origem de replicação

Geralmente, não é necessária uma componente origem de replicação para vectores de expressão em mamífero. Por exemplo, a origem de SV40 pode tipicamente ser utilizada apenas porque contém o promotor precoce.

Componente gene de selecção

Os vectores de expressão e de clonagem podem conter um gene de selecção, também denominado um marcador seleccionável. Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, *e.g.*, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, quando relevante, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos.

Um exemplo de um esquema de selecção utiliza um fármaco para parar o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência ao fármaco e assim sobrevivem ao regime de selecção. Os exemplos desta selecção dominante utilizam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para captar o ácido nucleico do anticorpo, tais como os genes de DHFR, timidina-quinase, metalotioneína-I e -II, preferivelmente genes de metalotioneína de primata, adenosina-desaminase, ornitina-descarboxilase, etc.

Por exemplo, em algumas concretizações, as células transformadas com o gene de selecção de DHFR são primeiro identificadas por cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Em algumas concretizações, uma célula hospedeira apropriada quando é empregue DHFR de tipo selvagem, é a linha células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em actividade de DHFR (*e.g.*, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, as células hospedeiras (particularmente hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN que codificam um anticorpo, proteína DHFR de tipo selvagem, e outro marcador seleccionável tal como aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH), podem ser seleccionadas por crescimento celular em meio contendo um agente de selecção para o marcador

selecciónável tal como um antibiótico aminoglicosídico, e.g., canamicina, neomicina ou G418. Veja-se a Patente U.S. 4,965,199.

Componente promotor

Os vectores de expressão e de clonagem usualmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado a ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse (e.g., um anticorpo). As sequências promotoras são conhecidas para os eucariotas. Por exemplo, virtualmente todos os genes eucariotas possuem uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do local onde é iniciada a transcrição. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucariotas está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para adição da cauda polipéptido A à extremidade 3' da sequência de codificação. Em determinadas concretizações, qualquer uma, ou todas estas sequências podem ser adequadamente inseridas em vectores de expressão eucariotas.

A transcrição a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como o poliomavírus, o poxvírus avícida, adenovírus (tais como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, sarcomavírus avícida, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B e Vírus Síntio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, e.g., o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos na forma de um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral de SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido na forma de um fragmento de restrição *Hind*III E. Um sistema para a expressão de ADN em hospedeiros de mamífero utilizando o papilomavírus bovino como vector está divulgado na Patente U.S. 4,419,446. Uma modificação deste sistema está descrita na Patente U.S. 4,601,978. Veja-se também Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982), que descrevem a

expressão de ADNc de -interferão humano em células de ratinho sob o controlo de um promotor de timidina-quinase a partir do vírus herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do Vírus do Sarcoma de Rous pode ser utilizada como promotor.

Componente elemento potenciador

A transcrição de ADN que codifica um anticorpo da presente invenção por eucariotas superiores é frequentemente aumentada por inserção de uma sequência potenciadora no vector. Muitas sequências potenciadoras são hoje conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de células eucariotas. Os exemplos incluem o potenciador de SV40 do lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador do polioma do lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. Veja-se também Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) que descrevem elementos potenciadores para a activação de promotores eucariotas. O potenciador pode ser unido por *splicing* no vector numa posição a 5' ou a 3' da sequência que codifica do polipeptído de anticorpo, mas está geralmente localizada num local a 5' do promotor.

Componente terminação da transcrição

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas podem também conter sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Estas sequências estão normalmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente a 3', de ADN ou ADNc eucariotas ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica um anticorpo. Uma componente terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Veja-se WO94/11026 e os vectores de expressão aí divulgados.

Seleção e transformação de células hospedeiras

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos presentes vectores incluem células eucariotas superiores aqui descritas, incluindo células hospedeiras de

vertebrado. A propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Os exemplos de linhas de células hospedeiras de mamífero úteis são a linha CVI de rim de macaco transformada com SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CVI ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato-búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W 138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão ou de clonagem acima descritos para a produção de anticorpo e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, selecção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas.

Cultura das células hospedeiras

As células hospedeiras utilizadas para produzir um anticorpo da presente invenção podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como meio F10 de Ham (Sigma), Meio Mínimo Essencial ((MEM)), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para a cultura das células hospedeiras. Em adição, qualquer dos meios descritos em Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Pat. U.S. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; ou 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Patente U.S. 30,985, pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros

factores de crescimento (tais como insulina, transferrina ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto e fosfato de sódio, cálcio, magnésio), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GENTAMYCINTTM), elementos traço (definidos como compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais na gama micromolar), e glucose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que serão conhecidos dos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, e pH, são as previamente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para a expressão, e serão evidentes para uma pessoa competente na matéria.

Purificação de anticorpo

Quando se utilizam técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, ou ser segregado directamente no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como primeiro passo, os detritos particulados, quer células hospedeiras quer fragmentos lisados, podem ser removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Quando o anticorpo é segregado para o meio, os sobrenadantes destes sistemas de expressão podem ser primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Pode ser incluído um inibidor de protease tal como PMSF em qualquer dos passos anteriores para inibir a proteólise, e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

A composição de anticorpos preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia em hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade uma técnica conveniente. A adequabilidade da proteína A como ligando de afinidade depende das espécies e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas 1, 2 ou 4 humanas (Lindström, J. *Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada

para todos os isotipos de ratinho e para 3 humana (Gusset al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado pode ser agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de poros controlados ou poli(estirenodivinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e menores tempos de processamento do que os que se conseguem com agarose. Quando o anticorpo comprehende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para a purificação. Outras técnicas para a purificação de proteínas tais como o fraccionamento numa coluna de permuta iônica, precipitação em etanol, HPLC de fase inversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™ cromatografia numa resina de permuta aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amónio, estão também disponíveis dependendo do anticorpo a recuperar.

Após qualquer passo ou passos preliminares de purificação, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a purificação adicional, por exemplo, por cromatografia de interacção hidrófoba a baixo pH utilizando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, preferivelmente realizada a baixas concentrações salinas (e.g., de cerca de 0-0,25M de sal).

Em geral, várias metodologias para a preparação de anticorpos para utilização em investigação, testes e uso clínico, estão bem estabelecidas na especialidade, consistentemente com as metodologias acima descritas e/ou como considerado apropriado por um perito na especialidade para um anticorpo de interesse particular.

Imunoconjugados

A invenção também proporciona imunoconjugados (indiferentemente referidos como "conjugados anticorpo-fármaco" ou "ADC") compreendendo anticorpos anti-STEAP-1 da invenção conjugados com um ou mais agentes citotóxicos, tais como um agente quimioterapêutico, um fármaco, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (e.g., uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioactivo (i.e., um radioconjunto).

Em determinadas concretizações, um imunoconjugado comprehende um anticorpo anti-STEAP-1 e um agente quimioterapêutico ou outra toxina. Agentes quimioterapêuticos úteis na geração de imunoconjugados estão aqui descritos (*e.g.*, acima). Toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos podem também ser utilizados e estão aqui descritos.

Em determinadas concretizações, um imunoconjugado comprehende um anticorpo anti-STEAP-1 e uma ou mais toxinas de molécula pequena, incluindo, mas não se lhes limitando, fármacos de molécula pequena tais como uma caliqueamicina, um maitansinóide, uma dolastatina, uma auristatina, um tricoteceno e CCl1065, e os derivados destes fármacos que têm actividade citotóxica. Os exemplos destes imunoconjugados são discutidos com mais detalhes adiante.

1. Imunoconjugados Exemplificativos

Um imunoconjugado (ou "conjugado anticorpo-fármaco" ("ADC")) da invenção pode ter a fórmula I, adiante, em que um anticorpo anti-STEAP-1 está conjugado (*i.e.*, covalentemente ligado) a uma ou mais porções de fármaco (D) através de um ligante opcional (L).



Desse modo, o anticorpo anti-STEAP-1 pode ser conjugado com o fármaco, directamente ou através de um ligante. Na Fórmula I, p é o número médio de porções de fármaco por anticorpo, que pode variar, *e.g.*, de cerca de 1 a cerca de 20 porções de fármaco por anticorpo, e em determinadas concretizações, de 1 a cerca de 8 porções de fármaco por anticorpo, *e.g.*, de 1 a 4.

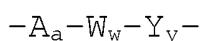
Ligantes Exemplificativos

Ligantes e porções de fármaco exemplificativos são aqui divulgados. Um ligante pode compreender uma ou mais componentes ligantes. As componentes ligantes exemplificativas incluem 6-maleimidocaproílo ("MC"), maleimidopropanoílo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" ou "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxicarbonilo (um "PAB"), N-Succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil-4-(N-

maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato ("SMCC"), N-Succinimidil-(4-iodoacetil)aminobenzoato ("SIAB"), e etilenoxi-CH₂CH₂O- na forma de uma ou mais unidades repetidas ("EO" ou "PEO"). São conhecidas na especialidade várias componentes ligantes, algumas das quais são descritas adiante.

Um ligante pode ser um "ligante clivável", que facilita a libertação de um fármaco na célula. Por exemplo, pode ser utilizado um ligante lábil aos ácidos (e.g., hidrazona), um ligante sensível a proteases (e.g., sensível a peptidase), um ligante fotolábil, ligante de dimetilo ou ligante contendo dissulfureto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); Patente U.S. 5,208,020).

Numa concretização, o ligante L de um ADC possui a fórmula:



em que:

- A- é uma unidade Extensora covalentemente ligada a um tiol de cisteína do anticorpo (Ab); a é 0 ou 1;
- cada -W- é independentemente uma unidade Aminoácido;
- w é independentemente um número inteiro que varia de 0 a 12;
- Y- é uma unidade Espaçadora covalentemente ligada à porção de fármaco; e
- y é 0, 1 ou 2.

Unidade Extensora

A unidade Extensora (-A-), quando presente, é capaz de ligar uma unidade anticorpo a uma unidade aminoácido (-W-). A este respeito um anticorpo (Ab) possui um grupo tiol de cisteína livre que pode formar uma ligação com um grupo funcional electrófilo de uma Unidade Extensora. Unidades Extensoras exemplificativas em conjugados de Fórmula I estão representadas pelas Fórmulas II e III, em que Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y são como definido acima, e R¹⁷ é um radical bivalente seleccionado entre (CH₂)_r, carbociclilo C₃-C₈, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arileno-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(carbociclilo C₃-C₈), (carbociclilo C₃-C₈)-(CH₂)_r, heterociclilo C₃-C₈, (CH₂)_r-(heterociclilo C₃-C₈), -(heterociclilo C₃-C₈)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rCH₂-

, - (CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, - (CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-
, - (CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, - (CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-
e - (CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-; onde R^b é H, alquilo C₁-C₆, fenilo,
ou benzilo; e r é independentemente um número inteiro que varia
de 1-10.

Arileno inclui radicais hidrocarbonetos aromáticos bivalentes de 6-20 átomos de carbono derivados pela remoção de dois átomos de hidrogénio do sistema de anel aromático. Os grupos arileno típicos incluem, mas não se lhes limitando, radicais derivados de benzeno, benzeno substituído, naftaleno, antraceno e bifenilo.

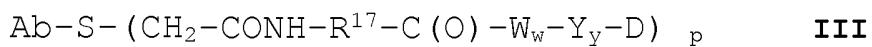
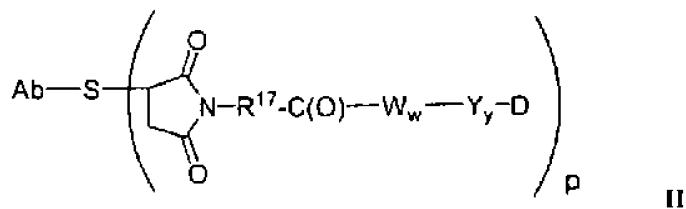
Os grupos heterociclilo incluem um sistema de anel em que um ou mais átomos no anel são heteroátomos, e.g. azoto, oxigénio e enxofre. O radical heterociclo compreende 1 a 20 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S. Um heterociclo pode ser um monociclo possuindo 3 a 7 membros no anel (2 a 6 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S) ou um biciclo possuindo 7 a 10 membros no anel (4 a 9 átomos de carbono e 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P e S), por exemplo: um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6]. São descritos heterociclos em Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente nos Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 e 9; - "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 até ao presente), em particular nos Volumes 13, 14, 16, 19 e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Os exemplos de heterociclos incluem, a título de exemplo e não como limitação, piridilo, di-hidropiridilo, tetra-hidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetra-hidrotiofenilo, tetra-hidrotiofenilo oxidado com enxofre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetra-hidrofuranilo, bis-tetra-hidrofuranilo, tetra-hidropiranilo, bis-tetra-hidropiranilo, tetra-hidro-quinolinilo, tetra-hidro-isoquinolinilo, deca-hidro-quinolinilo, octa-hidro-isoquinolinilo, azocinilo, triazinilo,

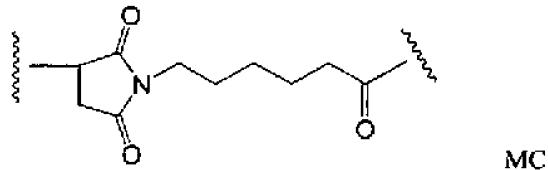
6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tian trenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, feno xatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4Ah-carbazolilo, carbazolilo, carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, feno xazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

Os grupos carbociclico incluem um anel saturado ou insaturado possuindo 3 a 7 átomos de carbono na forma de um monociclo ou 7 a 12 átomos de carbono na forma de um biciclo. Os carbociclos monocíclicos possuem 3 a 6 átomos no anel, ainda mais tipicamente 5 ou 6 átomos no anel. Os carbociclos bicíclicos possuem 7 a 12 átomos no anel, e.g. dispostos na forma de um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] ou [6,6], ou 9 ou 10 átomos no anel dispostos na forma de um sistema biciclo [5,6] ou [6,6]. Os exemplos de carbociclos monocíclicos incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclo-hexilo, 1-ciclo-hex-1-enilo, 1-ciclo-hex-2-enilo, 1-ciclo-hex-3-enilo, ciclo-heptilo e ciclo-octilo.

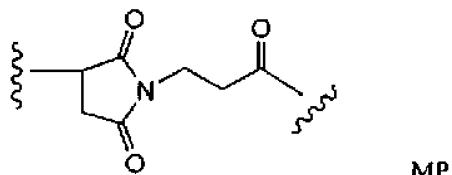
Deve entender-se de todas as concretizações exemplificativas de ADC de fórmula **I** tais como **II-VI**, que mesmo quando não explicitamente representado, 1 a 4 porções de fármaco estão ligadas a um anticorpo ($p = 1-4$), dependendo do número de resíduos de cisteína manipulados.



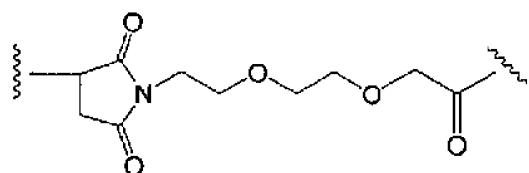
Uma unidade Extensora de Fórmula **II** ilustrativa é derivada de maleimidocaproílo (MC) em que R¹⁷ é -(CH₂)₅-:



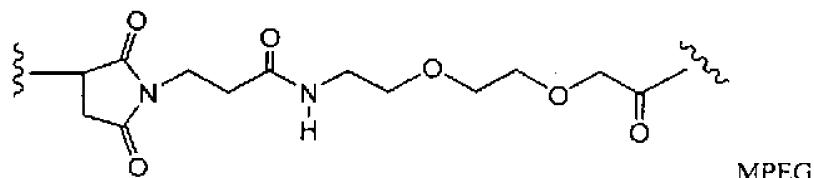
Uma unidade Extensora de fórmula **II** ilustrativa é derivada de maleimidopropanoílo (MP) em que R¹⁷ é -(CH₂)₂-:



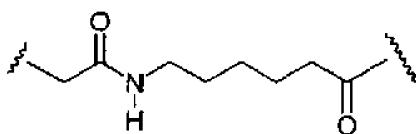
Outra unidade Extensora de fórmula **II** ilustrativa em que R¹⁷ é -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- e r é 2:



Outra unidade Extensora de fórmula **II** ilustrativa em que R¹⁷ é -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- onde R^b é H e cada r é 2:

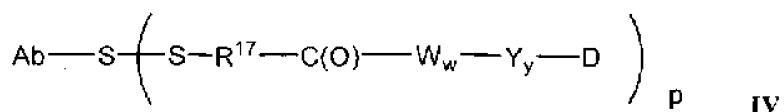


Uma unidade Extensora de fórmula **III** ilustrativa em que R¹⁷ é -(CH₂)₅-:

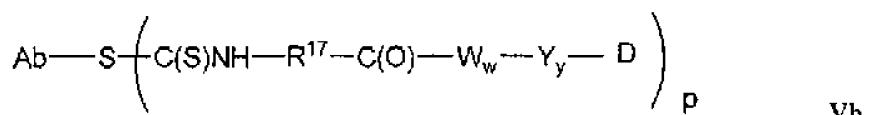
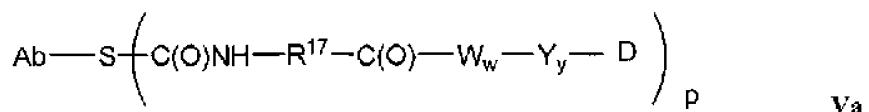


Em outra concretização, a unidade Extensora está ligada ao anti-anticorpo manipulado com cisteína através de uma ligação

dissulfureto entre o átomo de enxofre da cisteína manipulada do anticorpo e um átomo de enxofre da unidade Extensora. Uma unidade Extensora representativa desta concretização está representada pela Fórmula IV, em que R¹⁷, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y são como definido acima.



Em ainda outra concretização, o grupo reactivo do Extensor contém um grupo funcional reactivo com tiol que pode formar uma ligação com um tiol livre de cisteína de um anticorpo. Os exemplos de grupos funcionais reactivos com tiol incluem, mas não se lhes limitando, maleimida, -halogenoacetilo, ésteres activados tais como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anidridos, cloretos ácidos, cloretos de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. As unidades Extensoras representativas desta concretização estão representadas pelas Fórmulas **Va** e **Vb**, em que -R¹⁷- , Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y são como definido acima;

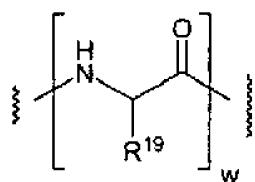


Em outra concretização, o ligante pode ser um ligante do tipo dendrítico para fixação covalente de mais do que uma porção de fármaco através de uma porção ligante multifuncional ramificadora, a um anticorpo (Sun et al. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al. (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Os ligantes dendríticos podem aumentar a razão molar de fármaco para anticorpo, i.e. a carga, que está relacionada com a potência do ADC. Assim, quando um anticorpo manipulado com cisteína é portador apenas de um grupo tiol de cisteína reactivo, podem ser ligados uma pluralidade de porções de fármacos através de um ligante dendrítico.

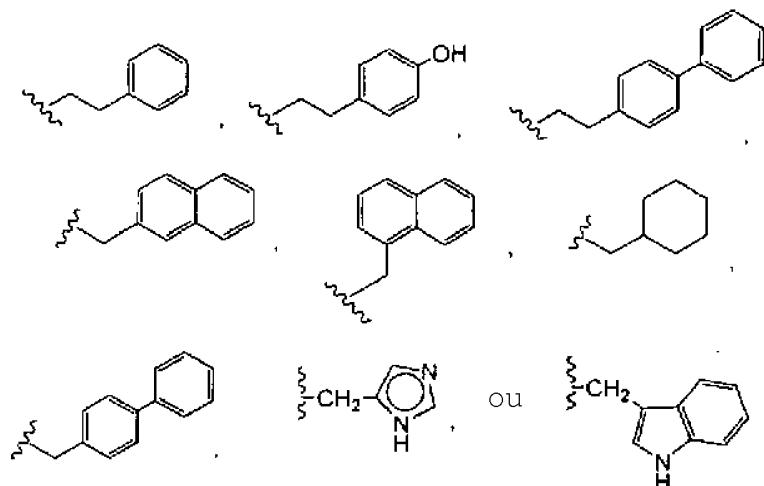
Unidade aminoácido

O ligante pode compreender resíduos de aminoácido. A unidade Aminoácido ($-W_w-$), quando presente, liga o anticorpo (Ab) à porção de fármaco (D) do conjugado anticorpo manipulado com cisteína-fármaco (ADC) da invenção.

$-W_w-$ é uma unidade dipeptídica, tripeptídica, tetrapeptídica, pentapeptídica, hexapeptídica, heptapeptídica, octapeptídica, nonapeptídica, decapeptídica, undecapeptídica ou dodecapeptídica. Os resíduos de aminoácido que constituem a unidade Aminoácido incluem os de ocorrência natural, assim como aminoácidos menores e análogos de aminoácido que não de ocorrência natural, tais como citrulina. Cada unidade $-W-$ possui independentemente a fórmula representada adiante entre parêntesis rectos, e w é um número inteiro que varia de 0 a 12:



em que R^{19} é hidrogénio, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, benzilo, p-hidroxibenzilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetyl-, 3-piridilmetyl-, 4-piridilmetyl-, fenilo, ciclo-hexilo,



Quando R^{19} é outro que não hidrogénio, o átomo de carbono ao qual R^{19} está ligado é quiral. Cada átomo de carbono a que R^{19} está ligado está independentemente na configuração (S) ou (R), ou numa mistura racémica. As unidades Aminoácido podem assim ser enantiomericamente puras, racémicas ou diastereoméricas.

As unidades Aminoácido $-W_w-$ exemplificativas incluem um dipéptido, um tripéptido, um tetrapéptido ou um pentapéptido. Os dipéptidos exemplificativos incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), alanina-fenilalanina (af ou ala-phe). Os tripéptidos exemplificativos incluem: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Os resíduos de aminoácido que constituem uma componente ligante de aminoácido incluem os de ocorrência natural, assim como aminoácidos menores e análogos de aminoácido que não de ocorrência natural, tais como citrulina.

A unidade Aminoácido pode ser clivada enzimaticamente por uma ou mais enzimas, incluindo uma protease associada a tumores, para libertar a porção de Fármaco (-D), que, numa concretização, é protonada *in vivo* após libertação para proporcionar um Fármaco (D). As componentes ligantes de aminoácido podem ser desenhadas e optimizadas na sua selectividade para clivagem enzimática por uma enzima particular, por exemplo, uma protease associada a tumores, catepsina B, C e D, ou uma plasmina-protease.

Unidade Espaçadora

A unidade Espaçadora ($-Y_y-$), quando presente ($y = 1$ ou 2), liga uma unidade Aminoácido ($-W_w-$) à porção de fármaco (D) quando uma unidade Aminoácido está presente ($w = 1-12$). Alternativamente, a unidade Espaçadora liga a unidade Extensora à porção de Fármaco quando a unidade Aminoácido está ausente. A unidade Espaçadora também liga a porção de fármaco à unidade anticorpo quando estão ausentes tanto a unidade Aminoácido como a unidade Extensora ($w, y = 0$). As unidades Espaçadoras são de dois tipos genéricos: auto-imolativas e não auto-imolativas. Uma unidade Espaçadora não auto-imolativa é uma em que parte ou a totalidade da unidade Espaçadora permanece ligada à porção de Fármaco após clivagem, particularmente enzimática, de uma unidade Aminoácido do conjugado anticorpo-fármaco ou da porção de Fármaco-Ligante. Quando um ADC contendo uma unidade

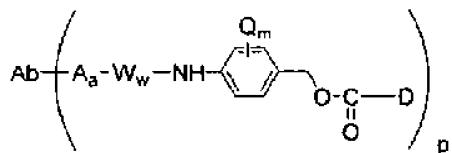
Espaçadora glicina-glicina ou uma unidade Espaçadora glicina sofre clivagem enzimática através de uma protease associada a células tumorais, uma protease associada a células cancerosas ou uma protease associada a linfócitos, uma glicina-glicina-porção de Fármaco ou uma glicina-porção de Fármaco é clivada de Ab-A_a-W_w- . Numa concretização, ocorre uma reacção de hidrólise independente no interior da célula alvo, clivando a ligação glicina-porção de Fármaco e libertando o Fármaco.

Em outra concretização, -Y_y- é uma unidade p-aminobenzilcarbamóilo (PAB) cuja porção feníleno está substituída com Q_m em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogéneo, -nitro ou -ciano; e m é um número inteiro que varia de 0-4.

As concretizações exemplificativas de uma unidade Espaçadora não auto-imolativa (-Y-) são: -Gly-Gly- ; -Gly- ; -Ala-Phe- ; -Val-Cit- .

Numa concretização, é proporcionado uma porção de Fármaco-ligante ou um ADC em que a unidade Espaçadora está ausente (y=0), ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitáveis.

Alternativamente, um ADC contendo uma unidade Espaçadora auto-imolativa pode libertar -D. Numa concretização, -Y- é um grupo PAB que está ligado a -W_w- através do átomo de azoto do amino do grupo PAB, e ligado directamente a -D através de um grupo carbonato, carbamato ou éter, em que o ADC possui a estrutura exemplificativa:

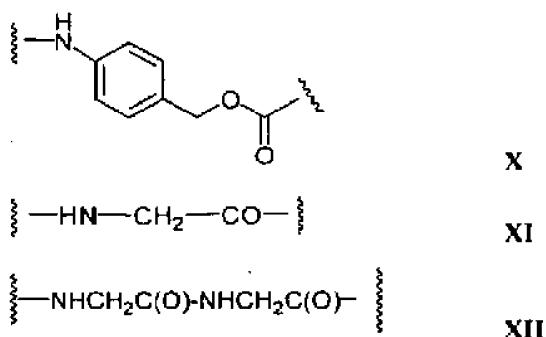


em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogéneo, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4; e p varia de 1 a 4.

Outros exemplos de espaçadores auto-imolativos incluem, mas não se lhes limitando, compostos aromáticos que são electronicamente similares ao grupo PAB tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), análogos de PAB heterocíclicos

(US 2005/0256030), beta-glucuronida (WO 2007/011968), e orto-ou para-aminobenzilacetais. Podem ser utilizados espaçadores que sofrem ciclização após hidrólise da ligação amida, tais como amidas de ácido 4-aminobutírico substituídas e não substituídas (Rodrigues et al. (1995) *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anel biciclo[2.2.1] e biciclo[2.2.2] apropriadamente substituídos (Storm et al. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) e amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al. (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). A eliminação de fármacos contendo amino que estão substituídos na glicina (Kingsbury et al. (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447) são também exemplos de espaçadores auto-imolativos úteis nos ADC.

As unidades Espaçadoras exemplificativas ($-Y_y-$) são representadas pelas Fórmulas **X-XII**:

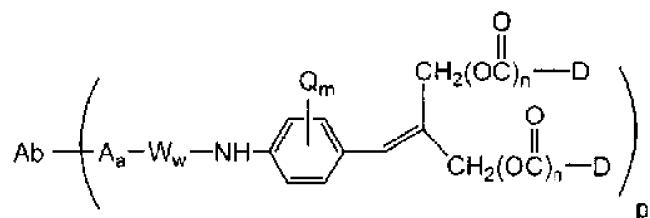


Ligantes dendríticos

Em outra concretização, o ligante L pode ser um ligante do tipo dendrítico para fixação covalente de mais do que uma porção de fármaco através de uma porção ligante multifuncional ramificadora, a um anticorpo (Sun et al. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al. (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Os ligantes dendríticos podem aumentar a razão molar de fármaco para anticorpo, i.e. a carga, que está relacionada com a potência do ADC. Assim, quando um anticorpo manipulado com cisteína é portador apenas de um grupo tiol de cisteína reactivo, podem ser ligadas uma pluralidade de porções de fármaco através de um ligante dendrítico. As concretizações exemplificativas de ligantes dendríticos ramificados incluem unidades de dendrímero 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol e 2,4,6-tris(hidroximetil)fenol (WO 2004/01993; Szalai et al. (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689; Shamis et al. (2004) *J. Amer. Chem. Soc.*

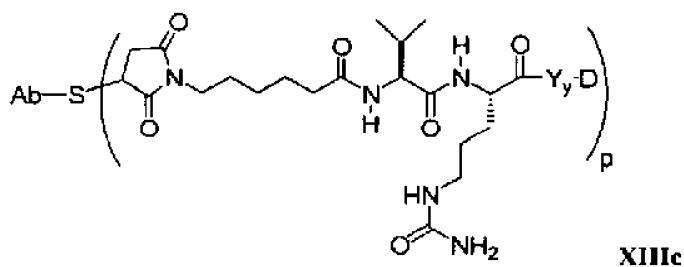
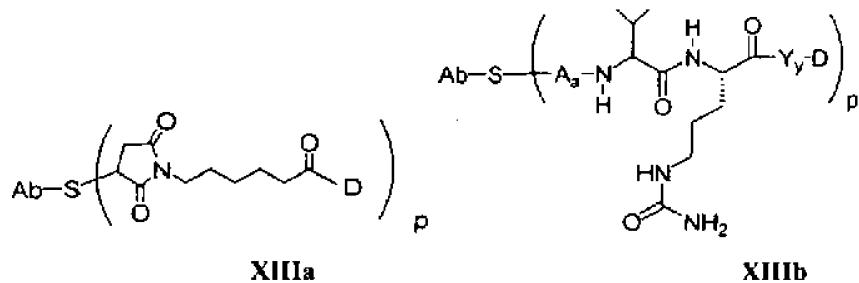
126:1726-1731; Amir *et al.* (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499).

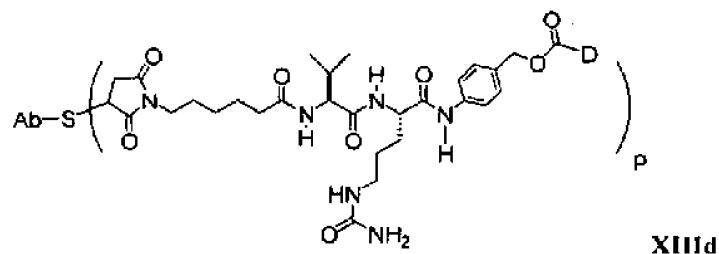
Numa concretização, a unidade Espaçadora é um bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado, que pode ser utilizado para incorporar e libertar múltiplos fármacos, possuindo a estrutura:



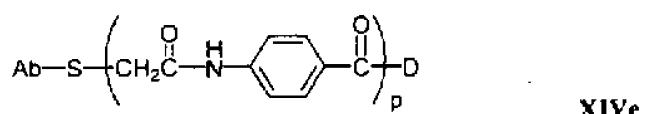
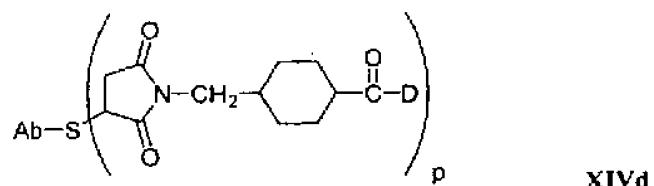
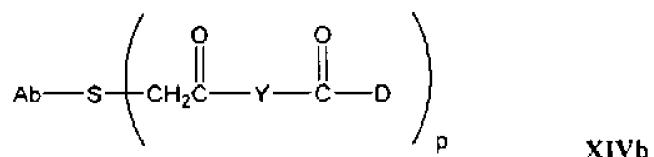
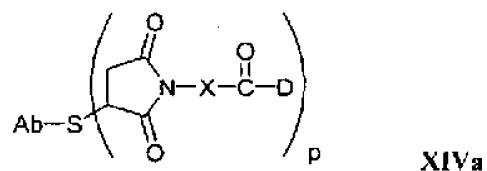
compreendendo uma unidade de dendrímero 2-(4-aminobenzilideno)propano-1,3-diol (WO 2004/043493; de Groot *et al.* (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494), em que Q é -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halogéneo, -nitro ou -ciano; m é um número inteiro que varia de 0-4; n é 0 ou 1; e p varia de 1 a 4.

As concretizações exemplificativas dos compostos conjugados anticorpo-fármaco de Fórmula I incluem **XIIIA** (MC), **XIIIB** (val-cit), **XIIIC** (MC-val-cit), e **XIIID** (MC-val-cit-PAB):

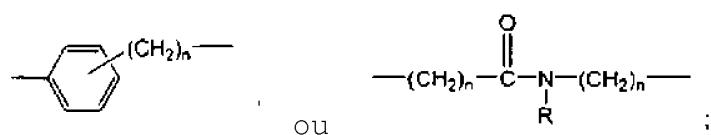
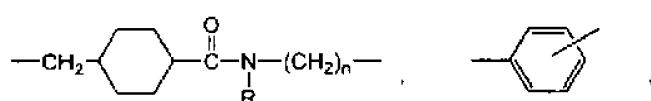
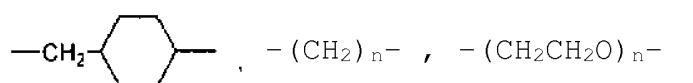




Outras concretizações exemplificativas dos compostos conjugados anticorpo-fármaco de Fórmula **Ia** incluem **XIVa-e**:



onde X é:



Y é:



e R é independentemente H ou alquilo C₁-C₆; e n é 1 a 12.

Em outra concretização, um Ligante possui um grupo funcional reactivo que possui um grupo nucleófilo que é reactivo com um grupo electrófilo presente num anticorpo. Os grupos electrófilos úteis num anticorpo incluem, mas não se lhes limitando, grupos carbonilo de aldeídos e cetonas. O heteroátomo de um grupo nucleófilo de um Ligante pode reagir com um grupo electrófilo num anticorpo e formar uma ligação covalente com uma unidade de anticorpo. Os grupos nucleófilos úteis num Ligante incluem, mas não se lhes limitando, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tio-semicarbazona, hidrazinocarboxilato e aril-hidrazida. O grupo electrófilo num anticorpo proporciona um local conveniente para fixação a um Ligante.

Tipicamente, Ligantes do tipo peptídico podem ser preparados por formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos. Estas ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese em fase líquida (E. Schröder e K. Lübke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química dos péptidos. Os intermediários dos Ligantes podem ser montados com qualquer combinação ou sequência de reacções incluindo unidades Espaçadoras, Extensoras e de Aminoácidos. As unidades Espaçadora, Extensora e de Aminoácidos podem empregar grupos reactivos funcionais que são de natureza electrófila, nucleófila ou de radical livre. Os grupos funcionais reactivos incluem, mas não se lhes limitando, carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato e grupos rejeitados, tais como O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, -I; ou maleimida.

Em outra concretização, o Ligante pode estar substituído com grupos que modulam a solubilidade ou a reactividade. Por exemplo, um substituinte carregado tal como sulfonato (-SO₃⁻) ou amónio, pode aumentar a solubilidade em água do reagente e facilitar a reacção de acoplamento do reagente ligante com o

anticorpo ou a porção de fármaco, ou facilitar a reacção de acoplamento de Ab-L (intermediário anticorpo-ligante) com D, ou D-L (intermediário fármaco-ligante) com Ab, dependendo da via sintética empregue para preparar o ADC.

Porções de fármaco exemplificativas

Maitansina e maitansinóides

Em algumas concretizações, um imunoconjunto compreende um anticorpo da invenção conjugado com uma ou mais moléculas de maitansinóide. Os maitansinóides são inibidores mitóticos que actuam por inibição da polimerização da tubulina. A maitansina foi isolada pela primeira vez a partir do arbusto da África oriental *Maytenus serrata* (Patente U.S. 3896111). Subsequentemente, verificou-se que certos micróbios também produzem maitansinóides, tais como maitansinol e ésteres de maitansinol C-3 (Patente U.S. 4,151,042). Maitansinol sintético e seus derivados e análogos estão divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; e 4,371,533.

As porções de fármaco maitansinóide são porções de fármaco atractivas em conjugados anticorpo-fármaco porque são: (i) de preparação relativamente acessível por fermentação ou modificação química ou derivatização de produtos de fermentação, (ii) susceptíveis de derivatização com grupos funcionais adequados para conjugação através de ligantes que não dissulfureto a anticorpos, (iii) estáveis no plasma, e (iv) eficazes contra uma variedade de linhas celulares tumorais.

Os compostos de maitansina adequados para utilização como porções de fármaco maitansinóide são bem conhecidos na especialidade e podem ser isolados a partir de fontes naturais de acordo com métodos conhecidos ou produzidos utilizando técnicas de engenharia genética (veja-se Yu et al. (2002) *PNAS* 99:7968-7973). O maitansinol e análogos de maitansinol podem também ser preparados sinteticamente de acordo com métodos conhecidos.

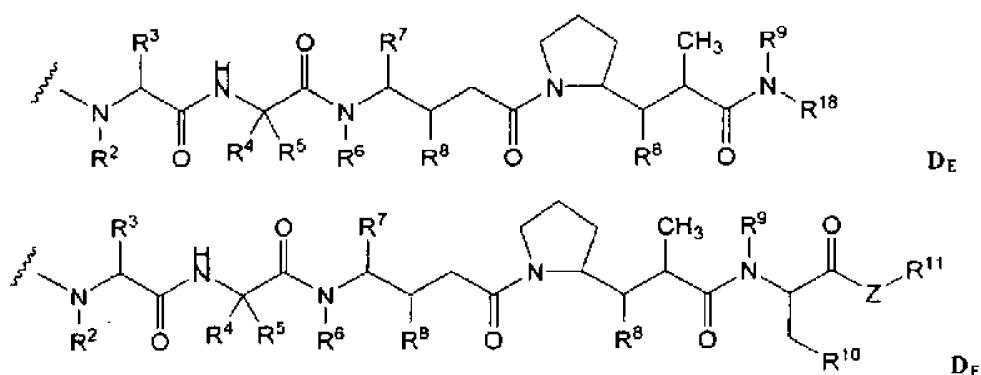
As concretizações exemplificativas de porções de fármaco maitansinóide incluem: DM1; DM3; e DM4, como aqui divulgado.

Auristatinas e dolastatinas

Em algumas concretizações, um imunoconjugado compreende um anticorpo da invenção conjugado com dolastatina ou um análogo peptídico ou um derivado de dolastatina, e.g., uma auristatina (Pat. US 5635483; 5780588). Mostrou-se que as dolastatinas e as auristatinas interferem com a dinâmica dos microtúbulos, a hidrólise de GTP e a divisão nuclear e celular (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) e possuem actividade antineoplásica (Pat. US 5663149) e antifúngica (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). A porção de fármaco de dolastatina ou de auristatina pode ser ligada ao anticorpo através do terminal N (amino) ou do terminal C (carboxilo) da porção de fármaco peptídico (WO 02/088172).

As concretizações exemplificativas de auristatina incluem as porções de fármaco de monometilauristatina ligadas no terminal N, DE e DF, divulgadas em Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, apresentado em 28 de Março, 2004.

Uma porção de fármaco peptídico pode ser seleccionada entre as Fórmulas DE e DF adiante:



em que a linha ondulada de DE e DF indica o local de fixação covalente a um anticorpo ou componente anticorpo-ligante, e independentemente em cada localização;

R² é seleccionado entre H e alquilo C₁-C₈;

R^3 é seleccionado entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil $C_1-C_8-($ carbociclo $C_3-C_8)$, heterociclo C_3-C_8 e alquil $C_1-C_8-($ heterociclo $C_3-C_8)$;

R^4 é seleccionado entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil $C_1-C_8-($ carbociclo $C_3-C_8)$, heterociclo C_3-C_8 e alquil $C_1-C_8-($ heterociclo $C_3-C_8)$;

R^5 é seleccionado entre H e metilo;

ou R^4 e R^5 formam conjuntamente um anel carbocíclico e possuem a fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ em que R^a e R^b são independentemente seleccionados entre H, alquilo C_1-C_8 e carbociclo C_3-C_8 e n é seleccionado entre 2, 3, 4, 5 e 6;

R^6 é seleccionado entre H e alquilo C_1-C_8 ;

R^7 é seleccionado entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil $C_1-C_8-($ carbociclo $C_3-C_8)$, heterociclo C_3-C_8 e alquil $C_1-C_8-($ heterociclo $C_3-C_8)$;

Cada R^8 é independentemente seleccionado entre H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 e O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 é seleccionado entre H e alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} é seleccionado entre arilo ou heterociclo C_3-C_8 ;

Z é O, S, NH ou NR¹², em que R¹² é alquilo C_1-C_8 ;

R^{11} é seleccionado entre H, alquilo C_1-C_{20} , arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ ou $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m é um número inteiro que varia de 1-1000;

R^{13} é alquilo C_2-C_8 ;

R^{14} é H ou alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{15} é independentemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ ou $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;

cada ocorrência de R^{16} é independentemente H, alquilo C_1-C_8 ou $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} é seleccionado entre $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8) e $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-($ carbociclo $C_3-C_8)$; e

n é um número inteiro que varia de 0 a 6.

Numa concretização, R^3 , R^4 e R^7 são independentemente isopropilo ou sec-butilo e R^5 é -H ou metilo. Numa concretização

exemplificativa, R³ e R⁴ são, cada um, isopropilo, R⁵ é -H, e R⁷ é sec-butilo.

Em ainda outra concretização, R² e R⁶ são, cada um, metilo e R⁹ é -H.

Em ainda outra concretização, cada ocorrência de R⁸ é -OCH₃.

Numa concretização exemplificativa, R³ e R⁴ são, cada um, isopropilo, R² e R⁶ são, cada um, metilo, R⁵ é -H, R⁷ é sec-butilo, cada ocorrência de R⁸ é -OCH₃, e R⁹ é -H.

Numa concretização, Z é -O- ou -NH-.

Numa concretização, R¹⁰ é arilo.

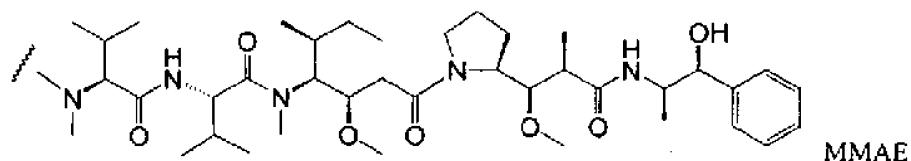
Numa concretização exemplificativa, R¹⁰ é -fenilo.

Numa concretização exemplificativa, quando Z é -O-, R¹¹ é -H, metilo ou t-butilo.

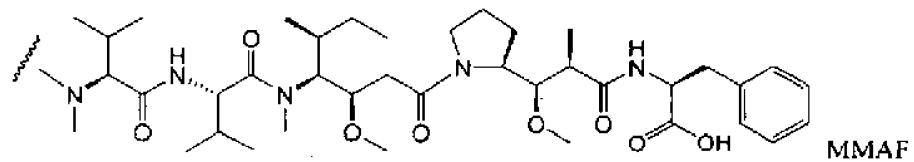
Numa concretização, quando Z é -NH, R¹¹ é -CH(R¹⁵)₂, em que R¹⁵ é -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂ e R¹⁶ é -alquilo C₁-C₈ ou -(CH₂)_n-COOH.

Em outra concretização, quando Z é -NH, R¹¹ é -CH(R¹⁵)₂, em que R¹⁵ é -(CH₂)_n-SO₃H.

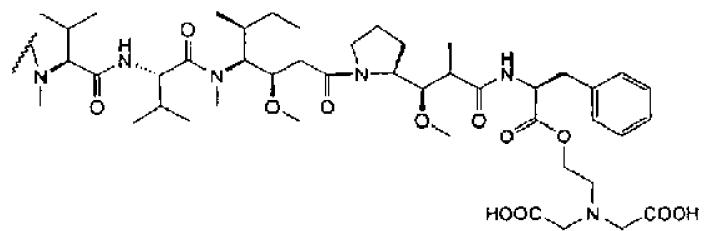
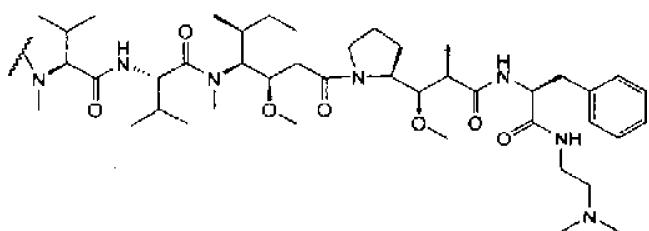
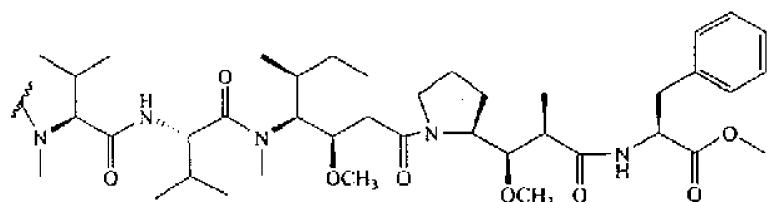
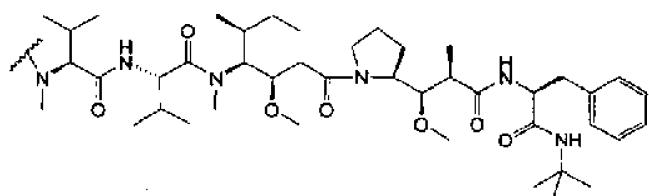
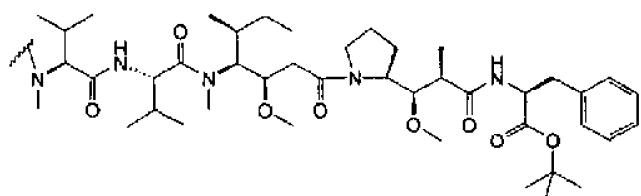
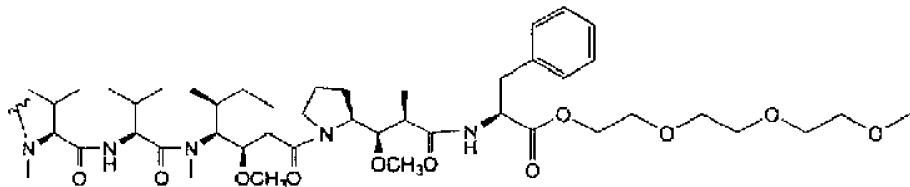
Uma concretização exemplificativa da auristatina de fórmula D_E é MMAE, em que a linha ondulada indica a fixação covalente a um ligante (L) de um conjugado anticorpo-fármaco:

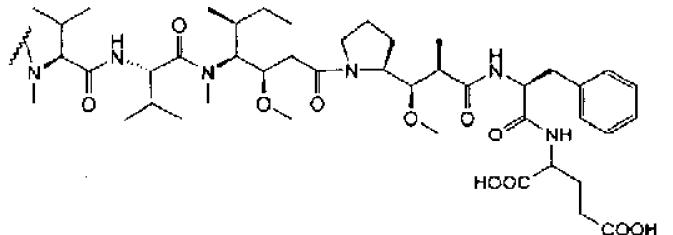
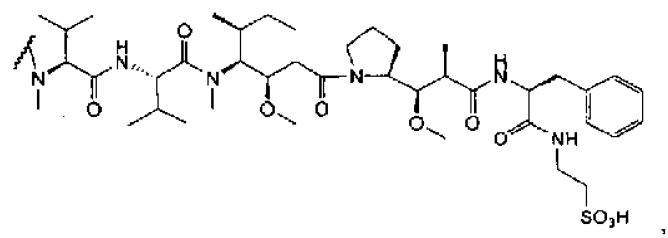


Uma concretização exemplificativa de auristatina de fórmula D_F é MMAF, em que a linha ondulada indica a fixação covalente a um ligante (L) de um conjugado anticorpo-fármaco (veja-se US 2005/0238649 e Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):

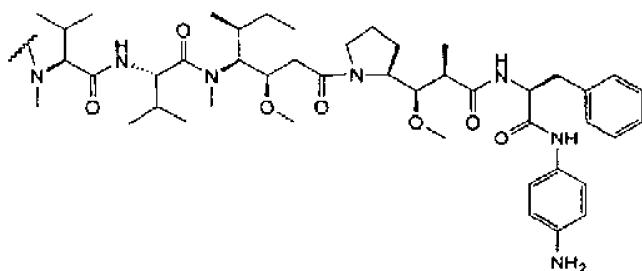


Outras porções de fármaco incluem os seguintes derivados de MMAF, em que a linha ondulada indica a fixação covalente a um ligante (L) de um conjugado anticorpo-fármaco:





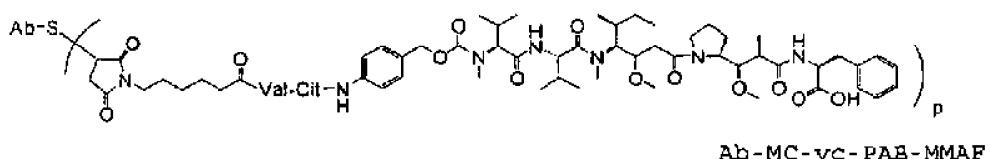
e

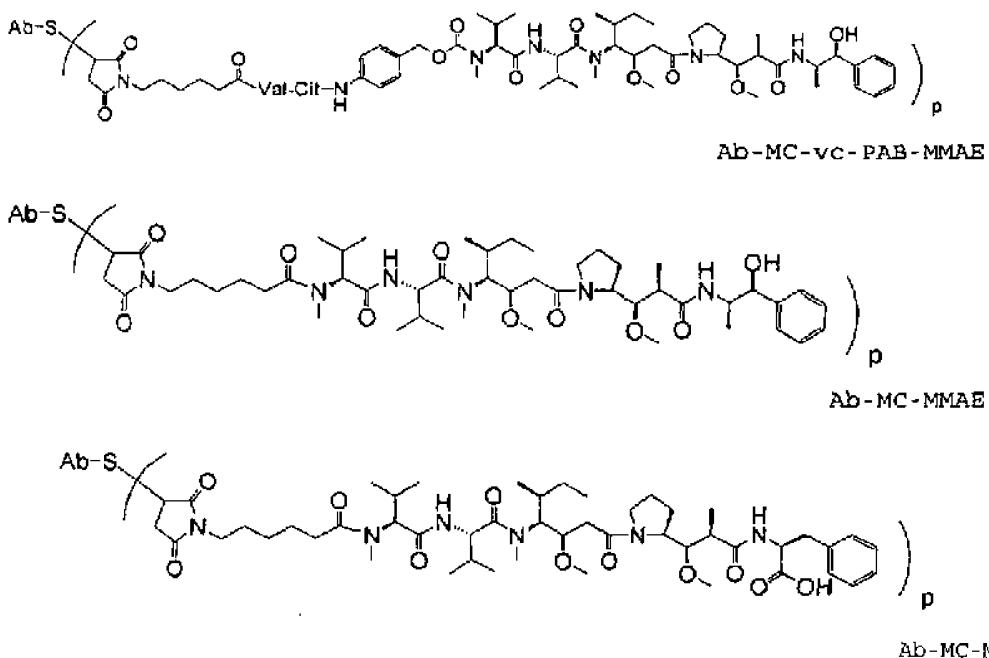


Num aspecto, grupos hidrófilos incluindo, mas não se lhes limitando, os ésteres de trietilenoglicol (TEG), como mostrado acima, podem ser ligados à porção de fármaco em R¹¹. Sem ligação a qualquer teoria em particular, os grupos hidrófilos ajudam na internalização e não aglomeração da porção de fármaco.

Concretizações exemplificativas de ADC de fórmula I compreendendo uma auristatina/dolastatina ou um seu derivado, estão descritas em US 2005-0238649 A1 e Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124.

Concretizações exemplificativas de ADC de fórmula I compreendendo MMAE ou MMAF e várias componentes ligantes possuem as seguintes estruturas e abreviaturas (em que "Ab" é um anticorpo; p é 1 a cerca de 8, "Val-Cit" é um dipéptido valina-citrulina; e "S" é um átomo de enxofre:





As concretizações exemplificativas de ADC de fórmula I compreendendo MMAF e várias componentes ligantes incluem adicionalmente Ab-MC-PAB-MMAF e Ab-PAB-MMAF. É interessante o facto de se ter mostrado que imunoconjugados compreendendo MMAF ligado a um anticorpo através de um ligante que não é proteoliticamente clivável, possuem actividade comparável com imunoconjugados compreendendo MMAF ligado a um anticorpo através de um ligante proteoliticamente clivável. Veja-se, Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Nestes casos, crê-se que a libertação do fármaco é efectuada por degradação do anticorpo na célula. *Id.*

Tipicamente, porções de fármaco à base de péptidos podem ser preparadas formando uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos. Estas ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese em fase líquida (veja-se E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química dos péptidos. As porções de fármaco de auristatina/dolastatina podem ser preparadas de acordo com os métodos de: US 2005-0238649 A1; Pat. US 5635483; Pat. US 5780588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-

725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863; e Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21 (7):778-784.

Em particular, as porções de fármaco de auristatina/dolastatina de fórmula D_F, tais como MMAF e seus derivados, podem ser preparadas utilizando métodos descritos em US 2005-0238649 A1 e Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. As porções de fármaco de auristatina/dolastatina de fórmula D_E, tais como MMAE e seus derivados, podem ser preparadas utilizando métodos descritos em Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. As porções Fármaco-ligante MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF e MC-vc-PAB-MMAE podem ser convenientemente sintetizadas por métodos de rotina, e.g., como descrito em Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, e Publicação de Pedido de Patente US 2005/0238649 A1, e depois conjugadas a um anticorpo de interesse.

Carga de fármaco

A carga de fármaco é representada por p e é o número médio de porções de fármaco por anticorpo numa molécula de fórmula I. A carga de fármaco pode variar de 1 a 20 porções de fármaco (D) por anticorpo. Os ADC de fórmula I incluem colecções de anticorpos conjugados com uma gama de porções de fármaco, de 1 a 20. O número médio de porções de fármaco por anticorpo em preparações de ADC a partir de reacções de conjugação pode ser caracterizado por meios convencionais tais como espectroscopia de massa, ensaio ELISA e HPLC. A distribuição quantitativa de ADC em termos de p pode também ser determinada. Em alguns casos, a separação, purificação e caracterização de ADC homogéneo em que p tem um determinado valor, de ADC com outras cargas de fármaco pode ser conseguida por meios como HPLC fase inversa ou electroforese.

Para alguns conjugados anticorpo-fármaco, p pode estar limitado pelo número de locais de fixação no anticorpo. Por exemplo, quando a fixação é num tiol de cisteína, como nas concretizações exemplificativas anteriores, um anticorpo pode ter apenas um ou vários grupos tiol de cisteína, ou pode ter apenas um ou vários grupos tiol suficientemente reactivos através dos quais um ligante pode ser ligado. Em determinadas concretizações, uma carga de fármaco superior, e.g. p >5, pode causar agregação, insolubilidade, toxicidade ou perda de

permeabilidade celular a determinados conjugados anticorpo-fármaco. Em determinadas concretizações, a carga de fármaco para um ADC da invenção varia de 1 a cerca de 8; de cerca de 2 a cerca de 6; de cerca de 3 a cerca de 5; de cerca de 3 a cerca de 4; de cerca de 3,1 a cerca de 3,9; de cerca de 3,2 a cerca de 3,8; de cerca de 3,2 a cerca de 3,7; de cerca de 3,2 a cerca de 3,6; de cerca de 3,3 a cerca de 3,8; ou de cerca de 3,3 a cerca de 3,7. De facto, foi demonstrado que para certos ADC, a razão óptima de porções de fármaco por anticorpo pode ser inferior a 8, e pode ser de cerca de 2 a cerca de 5. Veja-se US 2005-0238649 A1 (aqui incorporado por referência na sua totalidade).

Em determinadas concretizações, menos do que o máximo teórico de porções de fármaco são conjugadas a um anticorpo durante uma reacção de conjugação. Um anticorpo pode conter, por exemplo, resíduos de lisina que não reagem com o intermediário fármaco-ligante ou reagente ligante, como discutido adiante. Geralmente, os anticorpos não contêm muitos grupos tiol de cisteína livres e reactivos que possam ser ligados a uma porção de fármaco; de facto, a maioria dos tiol em resíduos de cisteína em anticorpos existem sob a forma de pontes de dissulfureto. Em determinadas concretizações, um anticorpo pode ser reduzido com um agente redutor tal como ditiotreitol (DTT) ou tricarboniletifosfina (TCEP), sob condições de redução parcial ou total, para gerar grupos tiol de cisteína reactivos. Em determinadas concretizações, um anticorpo é submetido a condições desnaturantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tais como lisina ou cisteína.

A carga (razão fármaco/anticorpo) de um ADC pode ser controlada de diferentes maneiras, e.g.: (i) limitando o excesso molar de intermediário fármaco-ligante ou reagente ligante relativamente ao anticorpo, (ii) limitando o tempo ou a temperatura da reacção de conjugação, (iii) limitando as condições de redução ou redução parcial para a modificação do tiol de cisteína, (iv) manipulando através de técnicas recombinantes a sequência de aminoácidos do anticorpo de modo a que o número e a posição de resíduos de cisteína sejam modificados para controlar o número e/ou a posição de ligações ligante-fármaco (tal como tioMab ou tioFab preparados como aqui divulgado e em WO2006/034488).

Deve entender-se que quando mais do que um grupo nucleófilo reage com um intermediário fármaco-ligante ou reagente ligante seguido por um reagente porção de fármaco, então o produto resultante é uma mistura de compostos ADC com uma distribuição de uma ou mais porções de fármaco ligadas a um anticorpo. O número médio de fármacos por anticorpo pode ser calculado a partir da mistura através de um ensaio ELISA dual ao anticorpo, que é específico para o anticorpo e específico para o fármaco. As moléculas de ADC individuais podem ser identificadas na mistura por espectroscopia de massa e separadas por HPLC, e.g. cromatografia de interacção hidrófoba (veja-se, e.g., Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, Março de 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugate", Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de Março, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, Março de 2004). Em determinadas concretizações, um ADC homogéneo com um valor único de carga pode ser isolado a partir da mistura de conjugação por electroforese ou cromatografia.

Certos Métodos de Preparação de Imunoconjungados

Um ADC de fórmula I pode ser preparado por várias vias empregando reacções de química orgânica, condições e reagentes conhecidos dos peritos na especialidade, incluindo: (1) reacção de um grupo nucleófilo de um anticorpo com um reagente ligante bivalente para formar Ab-L através de uma ligação covalente, seguida por reacção com uma porção de fármaco D; e (2) reacção de um grupo nucleófilo de uma porção de fármaco com um reagente ligante bivalente, para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguida por reacção com um grupo nucleófilo de um anticorpo. Os métodos exemplificativos para a preparação de um ADC de fórmula I através desta última via estão descritos em US 20050238649 A1.

Os grupos nucleófilos nos anticorpos incluem, mas não se lhes limitando: (i) grupos amino N-terminais, (ii) grupos amino de cadeias laterais, e.g. lisina, (iii) grupos tiol de cadeias

laterais, e.g. cisteína, e (iv) grupos hidroxilo ou amino de açúcares quando o anticorpo é glicosilado. Os grupos amino, tiol e hidroxilo são nucleófilos e capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligantes e reagentes ligantes incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformiatos e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e de benzilo tais como halogenoacetamidas; (iii) grupos aldeído, cetona, carboxilo e maleimido. Certos anticorpos possuem dissulfuretos redutíveis intercadeias, i.e. pontes de cisteína. Os anticorpos podem ser tornados reactivos para conjugação com reagentes ligantes por tratamento com um agente redutor tal como DTT (ditiotreitol) ou tricarboniletifosfina (TCEP), de modo a que o anticorpo seja completamente ou parcialmente reduzido. Cada ponte de cisteína irá portanto formar, teoricamente, dois nucleófilos de tiol reactivo. Grupos nucleófilos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos através de modificação de resíduos de lisina, e.g., por reacção de resíduos de lisina com 2-iminotiolano (reagente de Traut), resultando na conversão de um amino num tiol. Os grupos tiol reactivos podem ser introduzidos num anticorpo introduzindo um, dois, três, quatro ou mais resíduos de cisteína (e.g., preparando anticorpos variantes compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido de cisteína não nativos).

Os conjugados anticorpo-fármaco da invenção podem também ser produzidos por reacção entre um grupo electrófilo num anticorpo, tal como um grupo carbonilo de aldeído ou cetona, com um grupo nucleófilo num reagente ligante ou fármaco. Os grupos nucleófilos úteis num reagente ligante incluem, mas não se lhes limitando, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazinocarboxilato e aril-hidrazida. Numa concretização, um anticorpo é modificado para introduzir porções electrófilas que são capazes de reagir com substituintes nucleófilos no reagente ligante ou no fármaco. Em outra concretização, os açúcares de anticorpos glicosilados podem ser oxidados, e.g. com reagentes oxidantes de periodato, para formar grupos aldeído ou cetona que podem reagir com o grupo amino de reagentes ligantes ou porções de fármaco. Os resultantes grupos base de Schiff imina podem formar uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, e.g. por reagentes de boro-hidreto para formar ligações amino estáveis. Numa concretização, a reacção da porção

hidrato de carbono de um anticorpo glicosilado com galactose-oxidase ou meta-periodato de sódio, pode originar grupos carbonilo (aldeído e cetona) no anticorpo que podem reagir com grupos apropriados no fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). Em outra concretização, anticorpos contendo resíduos de serina ou treonina N-terminais podem reagir com meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Um tal aldeído pode ser reagido com uma porção de fármaco ou um ligante nucleófilo.

Os grupos nucleófilos numa porção de fármaco incluem, mas não se lhes limitando: grupos amino, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tio-semicarbazona, hidrazinocarboxilato e aril-hidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligantes e reagentes ligantes incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformiatos e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e de benzilo tais como halogenoacetamidas; (iii) grupos aldeído, cetona, carboxilo e maleimido.

Os compostos da invenção contemplam explicitamente, mas não se lhes limitando, ADC preparados com os seguintes reagentes reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, e sulfo-SMPB e SVSB ((4-vinilsulfono)benzoato de succinimidilo) que estão comercialmente disponíveis (e.g., em Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; vejam-se as páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

Os imunoconjungados compreendendo um anticorpo e um agente citotóxico podem também ser preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tais como suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)hexanodiamina), derivados bis-diazónio

(tais como bis-(p-diazóniobenzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um agente quelante exemplificativo para conjugação de radionucleótidos ao anticorpo. Veja-se WO94/11026.

Alternativamente, uma proteína de fusão compreendendo um anticorpo e um agente citotóxico pode ser preparada, *e.g.*, por técnicas recombinantes ou síntese peptídica. Uma molécula de ADN recombinante pode compreender regiões que codificam o anticorpo e porções citotóxicas do conjugado quer adjacentes uma à outra quer separadas por uma região que codifica um péptido ligante que não destrói as propriedades desejadas do conjugado.

Em ainda outra concretização, um anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcciónamento para tumores em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido por remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de depuração e depois administração de um "ligando" (*e.g.*, avidina) que está conjugado com um agente citotóxico (*e.g.*, um radionucleótido).

Preparação de anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína

Os métodos de desenho, selecção e preparação da invenção proporcionam adicionalmente anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína que são reactivos com a funcionalidade electrófila. Estes métodos proporcionam ainda compostos conjugados de anticorpo tais como compostos conjugado anticorpo-fármaco (ADC) com moléculas de fármacos em locais designados, desenhados, selectivos. Os resíduos de cisteína reactivos na superfície de um anticorpo permitem a conjugação específica de uma porção de fármaco através de um grupo tiol reactivo tal como maleimida ou halogenoacetilo. A reactividade nucleófila da funcionalidade tiol de um resíduo de Cys com um grupo maleimido é cerca de 1000 vezes superior em comparação com qualquer outra funcionalidade de aminoácido numa proteína, tais como grupos

amino de resíduos de lisina ou o grupo amino N-terminal. A funcionalidade tiol específica em reagentes iodoacetilo e maleimida pode reagir com grupos amino, mas são necessários pH superiores ($>9,0$) e tempos de reacção mais longos (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London). A quantidade de tiol livre numa proteína pode ser estimada através do ensaio de Ellman padrão. A imunoglobulina M é um exemplo de um pentâmero ligado por dissulfureto, enquanto a imunoglobulina G é um exemplo de uma proteína com pontes de dissulfureto internas que ligam as subunidades. Em proteínas como estas, a redução das ligações dissulfureto com um reagente tal como ditiotreitol (DTT) ou selenol (Singh et al. (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156) é necessária para gerar o tiol livre reactivo. Esta abordagem pode resultar na perda da estrutura terciária do anticorpo e da especificidade de ligação do抗原.

O Ensaio Pheselector (Phage ELISA para Selección de Tióis Reactivos) permite a detecção de grupos cisteína reactivos em anticorpos num formato de ELISA em fagos desse modo ajudando no desenho de anticorpos manipulados com cisteína (WO 2006/034488). O anticorpo manipulado com cisteína é aplicado como revestimento nas superfícies de poços, seguindo-se incubação com partículas fágicas, adição de anticorpo secundário marcado com HRP, e detecção de absorvância. As proteínas mutantes exibidas sobre fagos podem ser rastreadas de uma maneira rápida, robusta e de alto rendimento. Podem ser produzidas bibliotecas de anticorpos manipulados com cisteína e submetidas a selecção por ligação utilizando a mesma abordagem para identificar locais apropriadamente reactivos de incorporação de Cys livre a partir de bibliotecas de proteínas aleatórias em fagos de anticorpos ou outras proteínas. Esta técnica inclui a reacção de proteínas mutantes de cisteína exibidas em fagos com um reagente de afinidade ou um grupo repórter que é também reactivo com tiol.

O ensaio PHESELECTOR permite o rastreio de grupos tiol reactivos em anticorpos. A identificação da variante A121C por este método é exemplificativa. A totalidade da molécula de Fab pode ser eficazmente rastreada para identificar mais variantes TioFab com grupos tiol reactivos. Foi empregue um parâmetro, acessibilidade da superfície fraccionada, para identificar e

quantificar a acessibilidade do solvente aos resíduos de aminoácido num polipéptido. A acessibilidade à superfície pode ser expressa como a área da superfície (\AA^2) que pode ser contactada por uma molécula de solvente, e.g. água. O espaço ocupado de água é aproximadamente uma esfera de raio de 1,4 \AA . Está disponível gratuitamente ou sob licença software (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax: (+44) 1925 603825, ou através da internet: www ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como os programas de cristalografia CCP4 Suite que empregam algoritmos para calcular a acessibilidade à superfície de cada aminoácido de uma proteína com coordenadas derivadas de cristalografia de raios-x conhecidas ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) *Acta. Cryst.* D50:760-763). Dois módulos exemplificativos de software que realizam cálculos de acessibilidade à superfície são "AREAIMOL" e "SURFACE", baseados nos algoritmos de B. Lee e F.M. Richards (1971) *J.Mol.Biol.* 55:379-400. O AREAIMOL define a superfície acessível ao solvente de uma proteína como o locus do centro de uma esfera sonda (representando uma molécula de solvente) à medida que roda sobre a superfície de Van der Waals da proteína. O AREAIMOL calcula a área da superfície acessível ao solvente gerando pontos na superfície numa esfera estendida em torno de cada átomo (a uma distância do centro do átomo igual à soma dos raios do átomo e da sonda), e eliminando aqueles que se apresentam em esferas equivalentes associadas a átomos vizinhos. O AREAIMOL torna a área acessível ao solvente de átomos num ficheiro de coordenadas PDB, e resume a área acessível por resíduo, por cadeia e para a molécula completa. As áreas acessíveis (ou diferenças de áreas) para átomos individuais podem ser escritas num ficheiro de saída de pseudo-PDB. O AREAIMOL assume um único raio para cada elemento, e apenas reconhece um número limitado de diferentes elementos.

O AREAIMOL e o SURFACE reportam acessibilidades absolutas, i.e. o número de Angstroms (\AA) quadrados. A acessibilidade à superfície fraccionada é calculada por referência a um estado padrão relevante para um aminoácido num polipéptido. O estado de referência é o tripéptido Gly-X-Gly, onde X é o aminoácido de interesse, e o estado de referência deverá ser uma conformação 'estendida', i.e. como as das cadeias beta. A conformação estendida maximiza a acessibilidade de X. Uma área

acessível calculada é dividida pela área acessível num estado de referência do tripéptido Gly-X-Gly e reporta o quociente, que é a acessibilidade fraccionada. A percentagem de acessibilidade é a acessibilidade fraccionada multiplicada por 100. Outro algoritmo exemplificativo para calcular a acessibilidade à superfície é baseado no módulo SOLV do programa xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel) que calcula a acessibilidade fraccionada de um resíduo de aminoácido a uma esfera de água com base nas coordenadas de raios-x do polipéptido. A acessibilidade à superfície fraccionada para cada aminoácido num anticorpo pode ser calculada utilizando informação disponível sobre a estrutura cristalina (Eigenbrot et al. (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995).

O ADN que codifica os anticorpos manipulados com cisteína é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem como fonte deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou outras células hospedeiras de mamífero, tais como as células de mieloma (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que de outro modo não produzem a proteína do anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes.

Após o desenho e a selecção, os anticorpos manipulados com cisteína, e.g. TioFab, com os resíduos de Cys desemparelhados, manipulados, altamente reactivos, podem ser produzidos por: (i) expressão num sistema bacteriano, e.g. *E. coli*, (Skerra et al. (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262; Pluckthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188) ou num sistema de cultura de células de mamífero (WO 01/00245), e.g. células de ovário de hamster chinês (CHO); e (ii) purificação utilizando técnicas de purificação de proteínas comuns (Lowman et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988).

Os grupos tiol de Cys manipulados reagem com reagentes ligantes electrófilos e intermediários fármaco-ligante para

formar conjugados de anticorpo manipulado com cisteína e fármaco e outros anticorpos manipulados com cisteína marcados. Os resíduos de Cys de anticorpos manipulados com cisteína, e presentes nos anticorpos progenitores, que estão emparelhados e formam ligações dissulfureto intercadeias e intracadeias, não possuem quaisquer grupos tiol reactivos (a menos que tratados com um agente redutor) e não reagem com reagentes ligantes electrófilos ou intermediários fármaco-ligante. O resíduo de Cys recém-manipulado, pode permanecer desemparelhado, e capaz de reagir com, i.e. ser conjugado com, um reagente ligante electrófilo ou um intermediário fármaco-ligante, tal como um fármaco-maleimida. Os intermediários fármaco-ligante exemplificativos incluem: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE e MC-vc-PAB-MMAF. As posições na estrutura dos resíduos de Cys manipulados das cadeias pesadas e leves são numeradas de acordo com o sistema de numeração sequencial. Este sistema de numeração sequencial está correlacionado com o sistema de numeração de Kabat (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) começando no terminal N, e difere do esquema de numeração de Kabat (linha do fundo) por inserções indicadas como a,b,c. Utilizando o sistema de numeração de Kabat, a real sequência de aminoácidos linear pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais correspondentes a um encurtamento, ou uma inserção, em FR ou CDR do domínio variável. Os locais da variante de cadeia pesada manipulada com cisteína são identificados através dos esquemas de numeração sequencial e de numeração de Kabat.

O anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína pode ser preparado através de um processo compreendendo:

- (a) substituição de um ou mais resíduos de aminoácido de um anticorpo anti-STEAP-1 progenitor por cisteína; e
- (b) determinação da reactividade de tiol do anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína por reacção do anticorpo manipulado com cisteína com um reagente reactivo com tiol.

O anticorpo manipulado com cisteína pode ser mais reactivo do que o anticorpo progenitor com o reagente reactivo com tiol.

Os resíduos de aminoácido de cisteína livres podem estar localizados nas cadeias pesadas ou leves, ou nos domínios

constantes ou variáveis. Os fragmentos de anticorpo, e.g. Fab, podem também ser manipulados com um ou mais aminoácidos de cisteína em substituição de aminoácidos do fragmento de anticorpo, para formar fragmentos de anticorpo manipulados com cisteína.

A presente divulgação também proporciona um método de preparação (produção) de um anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína, compreendendo:

- (a) introdução de um ou mais aminoácidos de cisteína num anticorpo anti-STEAP-1 progenitor de modo a gerar o anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína; e
- (b) determinação da reactividade de tiol do anticorpo manipulado com cisteína com um reagente reactivo com tiol; em que o anticorpo manipulado com cisteína é mais reactivo do que o anticorpo progenitor com o reagente reactivo com tiol.

O passo (a) do método de preparação de um anticorpo manipulado com cisteína pode compreender:

- (i) mutagénese de uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo manipulado com cisteína;
- (ii) expressão do anticorpo manipulado com cisteína; e
- (iii) isolamento e purificação do anticorpo manipulado com cisteína.

O passo (b) do método de preparação de um anticorpo manipulado com cisteína pode compreender a expressão do anticorpo manipulado com cisteína numa partícula viral seleccionada entre uma partícula fágica ou de fagomídeo.

O passo (b) do método de preparação de um anticorpo manipulado com cisteína pode também compreender:

- (i) a reacção do anticorpo manipulado com cisteína com um reagente de afinidade reactivo com tiol para gerar um anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade; e
- (ii) a medição da ligação do anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade a um meio de captura.

Também é proporcionado um método de rastreio de anticorpos manipulados com cisteína com aminoácidos de cisteína desemparelhados, altamente reactivos, quanto a reactividade de tiol, compreendendo:

- (a) a introdução de um ou mais aminoácidos de cisteína num anticorpo progenitor de modo a gerar um anticorpo manipulado com cisteína;
- (b) a reacção do anticorpo manipulado com cisteína com um reagente de afinidade reactivo com tiol para gerar um anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade; e
- (c) a medição da ligação do anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade com um meio de captura; e
- (d) a determinação da reactividade de tiol do anticorpo manipulado com cisteína com o reagente reactivo com tiol.

O passo (a) do método de rastreio de anticorpos manipulados com cisteína pode compreender:

- (i) a mutagénese de uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo manipulado com cisteína;
- (ii) a expressão do anticorpo manipulado com cisteína; e
- (iii) o isolamento e a purificação do anticorpo manipulado com cisteína.

O passo (b) do método de rastreio de anticorpos manipulados com cisteína pode compreender a expressão do anticorpo manipulado com cisteína numa partícula viral seleccionada entre uma partícula fágica ou de fagomídeo.

O passo (b) do método de rastreio de anticorpos manipulados com cisteína pode também compreender:

- (i) a reacção do anticorpo manipulado com cisteína com um reagente de afinidade reactivo com tiol para gerar um anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade; e
- (ii) a medição da ligação do anticorpo manipulado com cisteína marcado por afinidade a um meio de captura.

Anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína marcados

Os anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína podem ser acoplados de modo específico do local e eficientemente a um reagente reactivo com tiol. O reagente reactivo com tiol pode ser um reagente ligante multifuncional, reagente marcador de captura, i.e. de afinidade, (e.g. um reagente ligante a biotina), um marcador de detecção (e.g. um reagente fluoróforo), um reagente de imobilização em fase sólida (e.g. SEPHAROSE™, poliestireno ou vidro), ou um intermediário fármaco-ligante. Um exemplo de um reagente reactivo com tiol é a N-etilmaleimida (NEM). Numa concretização exemplificativa, a reacção de um TioFab com um reagente biotina-ligante proporciona um TioFab biotinilado através do qual a presença e a reactividade do resíduo de cisteína manipulado podem ser detectadas e medidas. A reacção de um TioFab com um reagente ligante multifuncional proporciona um TioFab com um ligante funcionalizado que pode adicionalmente reagir com um reagente porção de fármaco ou outro marcador. A reacção de um TioFab com um intermediário fármaco-ligante proporciona um conjugado de TioFab e fármaco.

Os métodos exemplificativos aqui descritos podem ser aplicados genericamente à identificação e à produção de anticorpos, e mais genericamente, a outras proteínas através da aplicação dos passos de desenho e rastreio aqui descritos.

Esta abordagem pode ser aplicada à conjugação de outros reagentes reactivos com tiol em que o grupo reactivo é, por exemplo, uma maleimida, uma iodoacetamida, um dissulfureto de piridilo, ou outro parceiro de conjugação reactivo com tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. em *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). O reagente reactivo com tiol pode ser uma porção de fármaco, um fluoróforo tal como um corante fluorescente como a fluoresceína ou a rodamina, um agente quelante para um metal de imagiologia ou radioterapêutico, um marcador ou marca de detecção de peptidilo ou não-peptidilo, ou um agente de modificação da depuração tal como vários isómeros

de polietilenoglicol, um péptido que se liga a uma terceira componente, ou outro hidrato de carbono ou agente lipófilo.

Utilizações de anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína

Os anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína, e seus conjugados podem ser utilizados como agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico. A presente divulgação proporciona adicionalmente métodos de prevenção, gestão, tratamento ou melhoria de um ou mais sintomas associados a uma desordem relacionada com STEAP-1. Em particular, a presente divulgação proporciona métodos de prevenção, gestão, tratamento ou melhoria de um ou mais sintomas associados a uma desordem proliferativa celular, tal como o cancro, e.g., cancro da próstata, cancro do pulmão, cancro do cólon, cancro da bexiga, cancro ovariano e sarcoma de Ewing. A presente divulgação proporciona ainda, adicionalmente, métodos para o diagnóstico de uma desordem relacionada com STEAP-1 ou de uma predisposição para o desenvolvimento dessa desordem, assim como métodos para a identificação de anticorpos, e fragmentos de ligação ao抗ígeno de anticorpos, que se ligam preferencialmente a polipeptídos de STEAP-1 associados a células.

Também é proporcionada a utilização de um anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína para a preparação de um medicamento útil no tratamento de uma condição que é responsiva a uma desordem relacionada com STEAP-1.

Preparação de conjugados anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína-fármaco

O ADC de fórmula I pode ser preparado por várias vias, empregando reacções de química orgânica, condições e reagentes conhecidos dos peritos na especialidade, incluindo: (1) reacção de um grupo cisteína de um anticorpo manipulado com cisteína com um reagente ligante, para formar um intermediário anticorpo-ligante Ab-L, através de uma ligação covalente, seguida por reacção com uma porção de fármaco D activada; e (2) reacção de um grupo nucleófilo de uma porção de fármaco com um reagente ligante, para formar um intermediário de ligante e fármaco D-L, através de uma ligação covalente, seguida por reacção com um grupo cisteína de um anticorpo manipulado com cisteína. Os métodos de conjugação (1) e (2) podem ser empregues com uma variedade de anticorpos manipulados com cisteína, porções de

fármaco e ligantes para preparar os conjugados anticorpo-fármaco de fórmula I.

Os grupos tiol de cisteínas do anticorpo são nucleófilos e capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em reagentes ligantes e em intermediários fármaco-ligante incluindo: (i) ésteres activos tais como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformiatos e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e de benzilo, tais como halogenoacetamidas; (iii) grupos aldeído, cetona, carboxilo e maleimido; e (iv) dissulfuretos, incluindo dissulfuretos de piridilo, através de permuta de sulfureto. Os grupos nucleófilos numa porção de fármaco incluem, mas não se lhes limitando: grupos amino, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tio-semicarbazona, hidrazinocarboxilato e aril-hidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos electrófilos em porções ligantes e reagentes ligantes.

Os anticorpos manipulados com cisteína podem ser tornados reactivos para conjugação com reagentes ligantes por tratamento com um agente redutor tal como DTT (reagente Cleland, ditiotreitol) ou TCEP (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et al. (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido por reoxidação para voltar a formar ligações dissulfureto intercadeias e intracadeias. Por exemplo, anticorpos monoclonais manipulados com cisteína (TioMab) de comprimento completo expressos em células CHO são reduzidos com um excesso de cerca de 50 vezes de TCEP durante 3 h a 37°C para reduzir ligações dissulfureto em aductos de cisteína que se podem formar entre os resíduos de cisteína recém-introduzidos e a cisteína presente no meio de cultura. O TioMab reduzido é diluído e carregado numa coluna HiTrap S em acetato de sódio 10 mM, pH 5, e eluído com PBS contendo cloreto de sódio 0,3 M. As ligações dissulfureto foram restabelecidas entre resíduos de cisteína presentes no Mab progenitor com sulfato de cobre ($CuSO_4$) aquoso diluído (200 nM) à temperatura ambiente, durante a noite. Alternativamente, o ácido desidroascórbico (DHAA) é um oxidante eficaz para restabelecer os grupos dissulfureto intracadeia do anticorpo manipulado com cisteína após clivagem redutiva dos aductos de cisteína. Podem ser utilizados outros oxidantes, i.e. agentes oxidantes, e condições oxidantes, que são

conhecidos na especialidade. A oxidação com ar ambiente é também eficaz. Este passo de reoxidação parcial, moderada, forma eficientemente dissulfuretos intracadeia com elevada fidelidade e preserva os grupos tiol dos resíduos de cisteína recém-introduzidos. Adicionou-se um excesso de aproximadamente 10 vezes de intermediário fármaco-ligante, e.g. MC-vc-PAB-MMAE, misturou-se e deixou-se em repouso durante cerca de uma hora à temperatura ambiente para efectuar a conjugação e formar o conjugado anticorpo-fármaco. A mistura de conjugação foi filtrada em gel e carregada e eluída através de uma coluna HiTrap S para remover o excesso de intermediário fármaco-ligante e outras impurezas.

A Figura 16 mostra o processo geral para preparar um anticorpo manipulado com cisteína expresso a partir de uma cultura celular para conjugação. Quando o meio da cultura celular contém cisteína, podem-se formar aductos de dissulfureto entre o aminoácido de cisteína recém-introduzido e a cisteína do meio. Estes aductos de cisteína, representados com um círculo no TioMab exemplificativo (esquerda) na Figura 12, têm que ser reduzidos para gerar anticorpos manipulados com cisteína reactivos para conjugação. Os aductos de cisteína, presumivelmente em conjunto com várias ligações dissulfureto intercadeias, são clivados redutivamente para originar uma forma reduzida do anticorpo com agentes redutores tais como TCEP. As ligações dissulfureto intercadeias entre resíduos de cisteína emparelhados são novamente formadas sob condições de oxidação parcial com sulfato de cobre, DHAA, ou exposição ao oxigénio ambiente. Os resíduos de cisteína manipulados, recém-introduzidos, e não emparelhados, permanecem disponíveis para reacção com reagentes ligantes ou intermediários fármaco-ligante para formar os conjugados de anticorpo da invenção. Os TioMab expressos em linhas celulares de mamífero resultam num aducto de Cys conjugado externamente a uma Cys manipulada através da formação de ligações -S-S-. Portanto, os TioMab purificados são tratados com procedimentos de redução e reoxidação como descrito no Exemplo 5 para produzir TioMab reactivos. Estes TioMab são utilizados para conjugação com fármacos citotóxicos contendo maleimida, fluoróforos, e outros marcadores.

A Figura 15 mostra concretizações de conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco (ADC) onde uma porção de fármaco de auristatina é ligada a um grupo de cisteína manipulada em: a cadeia leve (LC-ADC); a cadeia pesada (HC-ADC); e a região Fc (Fc-ADC).

Formulações Farmacêuticas

Administração de conjugados anticorpo-fármaco

Os conjugados anticorpo-fármaco (ADC) da invenção podem ser administrados por qualquer via apropriada à condição a tratar. O ADC será tipicamente administrado parentericamente, i.e., por infusão, via subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural.

Para o tratamento de cancros, por exemplo, da próstata, do pulmão e/ou do cólon, numa concretização, o conjugado anticorpo-fármaco é administrado através de infusão intravenosa. A dosagem administrada por infusão está na gama de cerca de 1 µg/m² a cerca de 10 000 µg/m² por dose, geralmente uma dose por semana num total de uma, duas, três ou quatro doses. Alternativamente, a gama de dosagem é de cerca de 1 µg/m² a cerca de 1000 µg/m², de cerca de 1 µg/m² a cerca de 800 µg/m², cerca de 1 µg/m² a cerca de 600 µg/m², cerca de 1 µg/m² a cerca de 400 µg/m², cerca de 10 µg/m² a cerca de 500 µg/m², cerca de 10 µg/m² a cerca de 300 µg/m², cerca de 10 µg/m² a cerca de 200 µg/m², e cerca de 1 µg/m² a cerca de 200 µg/m². A dose pode ser administrada uma vez por dia, uma vez por semana, múltiplas vezes por semana, mas menos de uma vez por dia, múltiplas vezes por mês mas menos de uma vez por semana, uma vez por mês ou intermittentemente para reduzir ou aliviar os sintomas da doença. A administração pode continuar em qualquer dos intervalos divulgados até remissão do tumor ou dos sintomas do linfoma, leucemia a tratar. A administração pode continuar após remissão ou alívio dos sintomas quando essa remissão ou alívio são prolongados por essa administração continuada.

A divulgação também proporciona um método de tratamento de um cancro da próstata, do pulmão e/ou do cólon e/ou de uma metástase destes cancros, compreendendo a administração a um paciente que sofre de um cancro da próstata, do pulmão ou do cólon, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo

humanizado 120v.24 de qualquer uma das concretizações precedentes, anticorpo este que não está conjugado com uma molécula citotóxica ou uma molécula detectável. O anticorpo será tipicamente administrado numa gama de dosagem de cerca de 1 µg/m² a cerca de 1000 mg/m².

A divulgação também proporciona um método de tratamento de um cancro da próstata, do pulmão e/ou do cólon e/ou uma metástase destes cancros, compreendendo a administração a um paciente que sofre de um cancro da próstata, do pulmão ou do cólon, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo humanizado 120v.24 de qualquer uma das concretizações precedentes, anticorpo este que está conjugado com uma molécula citotóxica ou uma molécula detectável. O anticorpo será tipicamente administrado numa gama de dosagem de cerca de 1 µg/m² a cerca de 1000 mg/m².

Num aspecto, a invenção proporciona adicionalmente formulações farmacêuticas compreendendo pelo menos um anticorpo anti-STEAP-1 da invenção e/ou pelo menos um seu imunoconjungado e/ou pelo menos um conjugado anticorpo anti-STEAP-1-fármaco da invenção. Em algumas concretizações, uma formulação farmacêutica compreende 1) um anticorpo anti-STEAP-1 e/ou um conjugado anticorpo anti-STEAP-1-fármaco e/ou um seu imunoconjungado, e 2) um transportador farmaceuticamente aceitável. Em algumas concretizações, uma formulação farmacêutica compreende 1) um anticorpo anti-STEAP-1 e/ou um seu imunoconjungado, e opcionalmente, 2) pelo menos um agente terapêutico adicional.

As formulações farmacêuticas compreendendo um anticorpo ou um imunoconjungado da invenção ou o conjugado anticorpo-fármaco da invenção são preparadas para armazenagem por mistura do anticorpo ou do conjugado anticorpo-fármaco possuindo o grau desejado de pureza com transportadores, excipientes ou estabilizantes opcionais fisiologicamente aceitáveis (Remington' s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) na forma de soluções aquosas ou liofilizadas ou outras formulações secas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os beneficiários nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos;

antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto benzalcónico, cloreto de benzetónio); fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metilparabeno ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; complexos de metais (e.g., complexos Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG). As formulações farmacêuticas a utilizar para administração *in vivo* são geralmente estéreis. Isto é prontamente conseguido por filtração através membranas de esterilização por filtração.

Os ingredientes activos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas estão divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo ou o imunoconjunto da invenção, matrizes estas que estão na forma de artigos conformados, e.g., filmes, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactidas (Pat. U.S. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e -etyl-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato

de vinilo não degradáveis, de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos ou os imunoconjugados encapsulados permanecem no corpo durante um tempo longo, podem desnaturar ou agregar-se em resultado da exposição à humidade a 37°C, resultando uma perda de actividade biológica e possíveis alterações de imunogenicidade. Podem ser deduzidas estratégias racionais para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se é verificado que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intermoleculares através de interpermuta de tio-dissulfureto, a estabilização pode ser conseguida por modificação de resíduos de sulfidrilo, liofilização de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilizando aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matrizes poliméricas específicas.

Tratamentos com conjugado anticorpo-fármaco

Está contemplado que os conjugados anticorpo-fármaco (ADC) da presente invenção possam ser utilizados para tratar várias doenças ou desordens, e.g. caracterizadas pela sobre-expressão de um抗énio tumoral. Condições ou desordens hiperproliferativas exemplificativas incluem tumores benignos ou malignos; leucemia e malignidades linfóides. Outras incluem desordens neuronais, gliais, astrocitais, hipotalâmicas, glandulares, macrofágicas, epiteliais, estromais, blastocélicas; inflamatórias, angiogénicas e imunológicas, incluindo auto-imunes. Ainda outras incluem cancros da próstata, do pulmão e do cólon.

Os compostos ADC que são identificados nos modelos animais e em ensaios à base de células podem ser adicionalmente testados em ensaios clínicos em primatas superiores e seres humanos portadores de tumores. Podem ser desenhados ensaios clínicos em humanos para testar a eficácia do anticorpo monoclonal anti-STEAP-1 ou do imunoconjugado da invenção em pacientes que sofrem de uma desordem proliferativa celular da próstata, do

pulmão ou do cólon incluindo, sem limitação, os cancros da próstata, do pulmão e do cólon e metástases destes cancros. O ensaio clínico pode ser desenhado para avaliar a eficácia de um ADC em combinações com regimes terapêuticos conhecidos, tais como radiação e/ou quimioterapia envolvendo agentes quimioterapêuticos e/ou citotóxicos conhecidos.

O cancro pode compreender células que expressam STEAP-1, tal que um ADC da presente invenção seja capaz de se ligar às células cancerosas. Para determinar a expressão de STEAP-1 no cancro, estão disponíveis vários ensaios de diagnóstico/prognóstico. Numa concretização, a sobre-expressão de STEAP-1 pode ser analisada por IHC. Secções de tecido embebidas em parafina de uma biópsia tumoral podem ser submetidas ao ensaio IHC e é-lhes atribuído um critério de intensidade de coloração da proteína STEAP-1 em relação ao grau de coloração e na proporção das células tumorais examinadas.

Para a prevenção ou o tratamento de doenças, a dosagem apropriada de um ADC irá depender do tipo de doença a tratar, como acima definido, da gravidade e decurso da doença, se a molécula é administrada para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, do historial clínico do paciente e da resposta ao anticorpo, e da discrição do médico assistente. A molécula é adequadamente administrada ao paciente de uma só vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (e.g. 0,1-20 mg/kg) de molécula constituem uma dosagem inicial candidata para administração ao paciente, quer seja, por exemplo, em uma ou mais administrações separadas, quer seja por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores mencionados acima. Uma dosagem exemplificativa de ADC a administrar a um paciente está na gama de cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg de peso do paciente.

Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. Um regime de dosagem exemplificativo comprehende a administração de uma carga de dosagem inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida de uma dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg de um anticorpo

anti-STEAP-1. Podem ser úteis outros regimes de dosagem. A progressão desta terapia é facilmente monitorizada por técnicas e ensaios convencionais.

Terapia de Combinação

Um conjugado anticorpo-fármaco (ADC) da invenção pode ser combinado numa formulação farmacêutica de combinação, ou num regime de dosagem na forma de terapia de combinação, com pelo menos um composto adicional possuindo propriedades anticancerosas. O pelo menos um composto adicional da formulação farmacêutica de combinação ou regime de dosagem possui preferivelmente actividades complementares às do ADC da combinação de modo que não se afectam adversamente um ao outro.

O pelo menos um composto adicional pode ser um agente quimioterapêutico, um agente citotóxico, uma citoquina, um agente inibidor do crescimento, um agente anti-hormonal e/ou um cardioprotector. Estas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida. Uma composição farmacêutica contendo um ADC da invenção pode também possuir uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente quimioterapêutico tal como um inibidor da formação de tubulina, um inibidor de topoisomerase ou uma aglutinante de ADN.

Num aspecto, o primeiro composto é um ADC anti-STEAP-1 da invenção e o pelo menos um composto adicional é um anticorpo terapêutico outro que não um anti-STEAP-1 (anticorpo nu ou um ADC). Numa concretização, o pelo menos um composto adicional é um anticorpo anti-PSCA. Numa concretização o pelo menos um composto adicional é um anticorpo anti-HER2, trastuzumab (e.g., Herceptin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Numa concretização o pelo menos um composto adicional é um anticorpo anti-HER2, pertuzumab (Omnitarg™, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, veja-se US6949245). Numa concretização, o pelo menos um composto adicional é um anticorpo anti-VEGF (e.g., Avastin®, Genentech, Inc.). Em cada caso, o pelo menos um composto é um anticorpo nu ou um ADC). Numa concretização, o pelo menos um composto adicional é um anticorpo (um anticorpo nu ou um ADC), e o anticorpo adicional é um segundo, um terceiro, um quarto, um quinto, um sexto anticorpo ou mais, tal que uma combinação destes segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, ou

mais anticorpos (nus ou na forma de um ADC) é eficaz no tratamento de uma doença celular proliferativa num tecido que expressa STEAP-1.

Outros regimes terapêuticos podem ser combinados com a administração de um agente antincanceroso identificado de acordo com a presente invenção incluindo, sem limitação, terapia com radiação e/ou transplantes de medula óssea e sangue periférico e/ou um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico ou um agente inibidor do crescimento. Numa destas concretizações, um agente quimioterapêutico é um agente ou uma combinação de agentes tais como, por exemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, adriamicina, doxorrubicina, vincristina (OncovinTM), prednisolona, CHOP, CVP ou COP, ou imunoterapêuticos tais como anti-PSCA, anti-HER2 (e.g., Herceptin®, OmnitargTM) ou anti-VEGF (e.g., Avastin®). A terapia de combinação pode ser administrada na forma de um regime simultâneo ou sequencial. Quando administrada sequencialmente, a combinação pode ser administrada em duas ou mais administrações. A administração combinada inclui co-administração, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva por qualquer ordem, em que preferivelmente há um período de tempo durante o qual ambos (ou todos) os agentes activos exercem simultaneamente as suas actividades biológicas.

Numa concretização, o tratamento com um ADC envolve a administração combinada de um agente antincanceroso aqui identificado, e um ou mais agentes quimioterapêuticos ou agentes inibidores do crescimento, incluindo a co-administração de cocktails de diferentes agentes quimioterapêuticos. Os agentes quimioterapêuticos incluem taxanos (tais como paclitaxel e docetaxel) e/ou antibióticos de antraciclina. A preparação e os esquemas de dosagem para estes agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante ou como determinado empiricamente pelo técnico especialista. A preparação e esquemas de dosagem para esta quimioterapia estão também descritos em "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

As dosagens adequadas para muitos dos anteriores agentes co-administrados são as presentemente utilizadas e podem ser

diminuídas devido à acção combinada (sinergia) do agente recentemente identificado e outros agentes quimioterapêuticos ou tratamentos.

A terapia de combinação pode proporcionar "sinergia" e provar-se "sinérgica", i.e. o efeito conseguido quando os ingredientes activos são utilizados em conjunto é superior à soma dos efeitos que resultam da utilização dos compostos separadamente. Pode ser conseguido um efeito sinérgico quando os ingredientes activos são: (1) co-formulados e administrados ou entregues simultaneamente numa formulação combinada de dosagem unitária; (2) entregues em alternância ou em paralelo na forma de formulações separadas; ou (3) por algum outro regime. Quando entregues em terapia alternada, pode ser conseguido um efeito sinérgico quando os compostos são administrados ou entregues sequencialmente, e.g. através de diferentes injecções em seringas separadas. Em geral, durante a terapia alternada, é administrada sequencialmente uma dosagem eficaz de cada um dos ingredientes activos, i.e. em série, enquanto na terapia de combinação, são administradas em conjunto dosagens eficazes de dois ou mais ingredientes activos.

Metabolitos dos conjugados anticorpo-fármaco

Também caiem no presente âmbito os produtos metabólicos *in vivo* dos compostos ADC aqui descritos, na medida em que estes produtos são novos e não são óbvios em relação ao estado da técnica. Estes produtos podem resultar por exemplo de oxidação, redução, hidrólise, amidação, esterificação ou clivagem enzimática do composto administrado. Desse modo, inclui compostos novos e não óbvios produzidos por um processo compreendendo o contacto de um composto da presente invenção com um mamífero durante um período de tempo suficiente para obter um seu produto metabólico.

Os produtos metabolitos tipicamente são identificados pela preparação de um ADC radiomarcado (e.g. ^{14}C ou ^3H), a sua administração parentérica numa dose detectável (e.g. superior a cerca de 0,5 mg/kg) a um animal tal como o rato, ratinho, porquinho-da-índia, macaco ou o Homem, permitindo um tempo suficiente para que ocorra o metabolismo (tipicamente cerca de 30 segundos a 30 horas) e isolamento dos seus produtos de conversão a partir da urina, do sangue ou de outras amostras

biológicas. Estes produtos são facilmente isolados uma vez que estão marcados (outros são isolados utilizando anticorpos capazes de se ligar a epítopos que sobrevivem no metabolito). As estruturas dos metabolitos são determinadas da maneira convencional, e.g. por análise MS, LC/MS ou RMN. Em geral, a análise de metabolitos é realizada da mesma maneira que estudos convencionais de metabolismo de fármacos bem conhecidos dos peritos na especialidade. Os produtos de conversão, desde que não se encontrem de outro modo *in vivo*, são úteis em ensaios de diagnóstico para doseamento terapêutico dos compostos ADC da invenção.

Outros métodos de utilização de anticorpos anti-STEAP-1 e imunoconjugados

Métodos de diagnóstico e métodos de detecção

Os anticorpos anti-STEAP-1 e imunoconjugados da invenção são úteis para a detecção da presença de STEAP-1 numa amostra biológica. O termo "detecção", como aqui se utiliza, abrange a detecção quantitativa ou qualitativa. Uma amostra biológica compreende uma célula ou um tecido. Estes tecidos podem incluir tecidos normais e/ou cancerosos que expressam STEAP-1 em níveis mais elevados em comparação com outros tecidos, por exemplo, da próstata, do pulmão e do cólon.

A presente divulgação proporciona um método de detecção da presença de STEAP-1 numa amostra biológica. O método compreende o contacto da amostra biológica com um anticorpo anti-STEAP-1 sob condições permissivas para ligação do anticorpo anti-STEAP-1 a STEAP-1, e detecção se é formado um complexo entre o anticorpo anti-STEAP-1 e STEAP-1.

A presente divulgação proporciona um método de diagnóstico de uma desordem associada com expressão aumentada de STEAP-1. O método pode compreender o contacto de uma célula de teste com um anticorpo anti-STEAP-1; a determinação do nível de expressão (quantitativa ou qualitativa) de STEAP-1 pela célula de teste por detecção da ligação do anticorpo anti-STEAP-1 a STEAP-1; e a comparação do nível de expressão de STEAP-1 pela célula de teste com o nível de expressão de STEAP-1 por uma célula de controlo (e.g., uma célula normal do mesmo tecido de origem que a célula de teste ou uma célula que expressa STEAP-1 em níveis comparáveis a esta célula normal), em que um nível de expressão

de STEAP-1 superior pela célula de teste em comparação com a célula de controlo indica a presença de uma desordem associada a expressão aumentada de STEAP-1. A célula de teste pode ser obtida a partir de um indivíduo que se suspeita possuir uma desordem associada a expressão aumentada de STEAP-1. Em determinadas concretizações, a desordem é uma desordem proliferativa celular, tal como um cancro ou um tumor.

As desordens celulares proliferativas exemplificativas que podem ser diagnosticadas utilizando um anticorpo da invenção incluem os cancros da próstata, do pulmão e do cólon ou metástases destes cancros.

Um método de diagnóstico ou detecção, tal como os acima descritos, pode compreender a detecção da ligação de um anticorpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 expressa na superfície de uma célula ou numa preparação de membrana obtida de uma célula que expressa STEAP-1 na sua superfície. O método pode compreender o contacto de uma célula com um anticorpo anti-STEAP-1 sob condições permissivas à ligação do anticorpo anti-STEAP-1 a STEAP-1, e detecção se é formado um complexo entre o anticorpo anti-STEAP-1 e STEAP-1 na superfície celular. Um ensaio exemplificativo para detecção da ligação de um anticorpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 expressa na superfície de uma célula é um ensaio "FACS".

Determinados outros métodos podem ser utilizados para detectar a ligação de anticorpos anti-STEAP-1 a STEAP-1. Estes métodos incluem, mas não se lhes limitando, ensaios de ligação ao antígeno que são bem conhecidos na especialidade, tais como *Western blots*, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente com enzima ligada), imunoensaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios com proteína A e imuno-histoquímica (IHC).

Em determinadas concretizações, os anticorpos anti-STEAP-1 são marcados. Os marcadores incluem, mas não se lhes limitando, marcadores ou porções que são detectadas directamente (tais como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos em electrões, quimioluminescentes e radioactivos), assim como porções, tais como enzimas ou ligandos, que são detectados indirectamente, e.g., através de uma reacção enzimática ou uma

interacção molecular. Os marcadores exemplificativos incluem, mas não se lhes limitando, os radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tais como quelatos de terras-raras ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferases, e.g., luciferase de pirilampo e luciferase bacteriana (Pat. U.S. 4,737,456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinodionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina, -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases, e.g., glucose-oxidase, galactose-oxidase e glucose-6-fosfato-desidrogenase, oxidases heterocíclicas tais como uricase e xantina-oxidase, acopladas a uma enzima que emprega peróxido de hidrogénio para oxidar um precursor de um corante tal como HRP, lactoperoxidase ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores bacteriofágicos ou radicais livres estáveis.

Em determinadas concretizações, os anticorpos anti-STEAP-1 estão imobilizados numa matriz insolúvel. A imobilização implica a separação do antícorpo anti-STEAP-1 de qualquer STEAP-1 que permaneça livre em solução. Isto realiza-se convencionalmente ou insolubilizando o antícorpo anti-STEAP-1 antes do procedimento de ensaio, como por adsorção a uma matriz ou superfície insolúveis em água (Bennich et al., U.S. 3,720,760), ou por acoplamento covalente (por exemplo, utilizando reticulação com glutaraldeído), ou insolubilizando o antícorpo anti-STEAP-1 após a formação de um complexo entre o antícorpo anti-STEAP-1 e a STEAP-1, e.g., por imunoprecipitação.

O diagnóstico ou a detecção como descritos acima podem ser realizados utilizando um imunoconjunto da invenção em vez de, ou em adição a, um antícorpo anti-STEAP-1.

Métodos Terapêuticos

Um antícorpo ou um imunoconjunto da invenção podem ser utilizados, por exemplo, em métodos terapêuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. A divulgação proporciona métodos para a inibição do crescimento ou da proliferação celulares, quer *in vivo* quer *in vitro*, o método compreendendo a exposição de uma célula a um antícorpo anti-STEAP-1 ou um seu imunoconjunto sob condições permissivas à ligação do imunoconjunto a STEAP-1. "Inibição do crescimento ou proliferação celulares" significa a diminuição

do crescimento ou da proliferação de uma célula em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100%, e inclui a indução de morte da célula. A célula pode ser uma célula tumoral. A célula pode ser uma célula da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário, ou uma célula de sarcoma de Ewing. A célula pode ser um xenoenxerto, e.g., como aqui exemplificado.

Um anticorpo ou um imunoconjunto da invenção podem ser utilizados para tratar ou prevenir uma desordem proliferativa celular de células da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing. Em determinadas concretizações, a desordem proliferativa celular está associada a expressão e/ou actividade aumentadas de STEAP-1. Por exemplo, a desordem proliferativa celular de células da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing está associada a expressão aumentada de STEAP-1 na superfície de uma célula da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing. A desordem proliferativa celular de células da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing pode ser um tumor ou um cancro ou metástase destes cancros.

Num aspecto, a invenção proporciona métodos para tratamento de uma desordem proliferativa celular da próstata, do pulmão ou do cólon compreendendo a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-STEAP-1 ou de um seu imunoconjunto. O método para o tratamento de uma desordem proliferativa celular da próstata, do pulmão ou do cólon compreende a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de uma formulação farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-STEAP-1 ou um imunoconjunto anti-STEAP-1 e, opcionalmente, pelo menos um agente terapêutico adicional, tal como os aqui proporcionados.

Num aspecto, pelo menos alguns dos anticorpos ou imunoconjuntos da invenção podem ligar-se a STEAP-1 de uma espécie que não a humana. Desse modo, os anticorpos ou imunoconjuntos da invenção podem ser utilizados para ligar STEAP-1, e.g., numa cultura celular contendo STEAP-1, em seres humanos, ou em outros mamíferos possuindo uma STEAP-1 com que um anticorpo ou imunoconjunto da invenção reage de modo cruzado

(e.g. chimpanzé, babuíno, sagui, macacos *cynomolgus* e *rhesus*, cão, porco, rato ou ratinho). Numa concretização, um anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1 podem ser utilizados para direcccionamento à STEAP-1 em células da próstata, do pulmão ou do cólon por contacto do anticorpo ou do imunoconjungado com STEAP-1 para formar um anticorpo ou complexo imunoconjungado-antigénio de modo que uma citotoxina conjugada do imunoconjungado aceda o interior da célula. Numa concretização, a STEAP-1 a que o anticorpo anti-STEAP-1 se liga é STEAP-1 humana. Numa concretização, a STEAP-1 a que o anticorpo anti-STEAP-1 se liga é STEAP-1 de macaco *Cynomolgus*. Numa concretização, o anticorpo humanizado anti-STEAP-1 liga-se a STEAP-1 humana e/ou de macaco *Cynomolgus*.

Um anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1 podem ser utilizados num método para ligação de STEAP-1 num indivíduo que sofre de uma desordem associada a expressão e/ou actividade aumentadas de STEAP-1, o método compreendendo a administração ao indivíduo do anticorpo ou do imunoconjungado de modo que a STEAP-1 no indivíduo é ligada. Numa concretização, o anticorpo ou o imunoconjungado ligados são internalizados na célula da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou do ovário ou de sarcoma de Ewing que expressam STEAP-1. Numa concretização, a STEAP-1 é STEAP-1 humana, e o indivíduo é um indivíduo humano. Alternativamente, o indivíduo pode ser um mamífero que expressa STEAP-1 a que um anticorpo anti-STEAP-1 se liga. Ainda adicionalmente o indivíduo pode ser um mamífero em que foi introduzida STEAP-1 (e.g., por administração de STEAP-1 ou por expressão de um transgene que codifica STEAP-1).

Um anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1 podem ser administrados a um ser humano para fins terapêuticos. Adicionalmente, um anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1 podem ser administrados a um mamífero não humano que expressa STEAP-1 com que o anticorpo reage de modo cruzado (e.g., um primata, cão, porco, rato ou ratinho) para fins veterinários ou como animal modelo de doença humana. Em relação a este último, estes modelos animais podem ser úteis para avaliação da eficácia terapêutica de anticorpos ou imunoconjungados da invenção (e.g., teste de dosagens e decursos de tempo de administração).

Os anticorpos ou imunoconjugados da invenção podem ser utilizados singularmente ou em combinação com outras composições numa terapia. Por exemplo, um antícorpo ou imunoconjugado da invenção pode ser co-administrado com pelo menos um agente terapêutico adicional e/ou um adjuvante. Em determinadas concretizações, um agente terapêutico adicional é um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico ou um agente inibidor do crescimento. Numa destas concretizações, um agente quimioterapêutico é um agente ou uma combinação de agentes tais como, por exemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, adriamicina, doxorrubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP ou COP, ou imunoterapêuticos tais como anti-PSCA (veja-se, por exemplo, US6824780), anti-VEGF (e.g., Avastin®, Genentech, Inc.), anti-HER2 (e.g., Herceptin®, Omnitarg™ Genentech, Inc.), ou anti-HER2 em combinação com Taxol® (veja-se, por exemplo, BioWorld Today, Novembro 17, 1999, página 1), em que a terapia de combinação é útil no tratamento de desordens celulares proliferativas, cancros e/ou metástases de cancros da próstata, do pulmão e/ou do cólon.

Estas terapias de combinação acima referidas abrangem a administração combinada (em que dois ou mais agentes terapêuticos são incluídos na mesma formulação ou em formulações separadas), e a administração separada, caso em que a administração do antícorpo ou do imunoconjugado da invenção pode ocorrer antes de, simultaneamente com, e/ou após, a administração do agente terapêutico adicional e/ou do adjuvante. Os anticorpos ou imunoconjugados da invenção podem também ser utilizados em combinação com terapia com radiação.

Um antícorpo ou um imunoconjugado da invenção (e qualquer agente terapêutico adicional ou adjuvante) podem ser administrados através de qualquer meio adequado, incluindo administração parentérica, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, e, se desejado para tratamento local, intralesional. As infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em adição, o antícorpo ou o imunoconjugado são adequadamente administrados por infusão por pulsos, particularmente com doses decrescentes do antícorpo ou do imunoconjugado. A dosagem pode ser por qualquer via adequada, e.g. por injecções, tais como injecções intravenosas ou

subcutâneas, dependendo em parte de se a administração é breve ou crónica.

Os anticorpos ou imunoconjugados da invenção serão formulados, doseados e administrados de uma maneira consistente com a boa prática médica. Os factores a ter em consideração neste contexto incluem a desordem particular a tratar, o mamífero particular a tratar, a condição clínica do paciente individual, a causa da desordem, o local de entrega do agente, o método de administração, o esquema de administração, e outros factores conhecidos dos praticantes de medicina. O anticorpo ou o imunoconjugado não precisam de ser, mas são opcionalmente formulados com um ou mais agentes actualmente utilizados para prevenir ou tratar a desordem em questão. A quantidade eficaz destes outros agentes depende da quantidade de anticorpo ou de imunoconjugado presente na formulação, do tipo de desordem ou tratamento, e de outros factores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas dosagens e vias de administração aqui descritas, ou a cerca de 1 a 99% das dosagens aqui descritas, ou em qualquer dosagem e por qualquer via que empiricamente/clinicamente se determine apropriada.

Para a prevenção ou o tratamento de doenças, a dosagem apropriada de um anticorpo ou de um imunoconjugado da invenção (quando utilizados singularmente ou em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos adicionais, tais como agentes quimioterapêuticos) irá depender do tipo de doença a tratar, do tipo de anticorpo ou imunoconjugado, da gravidade e decurso da doença, se o anticorpo ou o imunoconjugado são administrados para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, do historial clínico do paciente e da resposta ao anticorpo ou ao imunoconjugado, e da discrição do médico assistente. O anticorpo ou o imunoconjugado são adequadamente administrados ao paciente de uma só vez ou durante uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg (e.g. 0,1 mg/kg-20mg/kg) de anticorpo ou imunoconjugado podem ser uma dosagem inicial candidata para administração ao paciente, quer, por exemplo, numa ou mais administrações separadas, quer por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores acima mencionados. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o

tratamento será geralmente sustentado até que ocorra uma supressão desejada de sintomas da doença. Uma dosagem exemplificativa do anticorpo ou do imunoconjunto estará na gama de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Assim, podem ser administradas ao paciente uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ou 10 mg/kg (ou qualquer sua combinação) de anticorpo ou imunoconjunto. Estas doses podem ser administradas intermitentemente, e.g. semanalmente ou de três em três semanas (e.g. de modo que o paciente recebe de cerca de duas a cerca de vinte, ou e.g. cerca de seis doses do anticorpo ou do imunoconjunto). Podem ser administradas uma dose de carga inicial superior, seguida de uma ou mais doses menores. Um regime de dosagem exemplificativo compreende a administração de uma dose de carga inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida de uma dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg do anticorpo. Contudo, podem ser úteis outros regimes de dosagem. A progressão desta terapia é facilmente monitorizada por técnicas e ensaios convencionais.

Ensaios

Os anticorpos e imunoconjuntos anti-STEAP-1 da invenção podem ser caracterizados pelas suas propriedades físicas/químicas e/ou actividades biológicas através de vários ensaios conhecidos na especialidade.

Ensaios à actividade

São proporcionados ensaios para a identificação de anticorpos anti-STEAP-1 ou seus imunoconjuntos possuindo actividade biológica. A actividade biológica pode incluir, e.g., a capacidade para inibir o crescimento ou a proliferação celulares (e.g., actividade de "morte celular"), ou a capacidade para induzir morte celular, incluindo morte celular programada (apoptose). São também proporcionados anticorpos ou imunoconjuntos possuindo esta actividade biológica *in vivo* e/ou *in vitro*.

Um anticorpo anti-STEAP-1 ou um seu imunoconjunto podem ser testados quanto à sua capacidade para inibir o crescimento ou a proliferação celulares *in vitro*. Os ensaios para inibição do crescimento ou da proliferação celulares são bem conhecidos na especialidade. Certos ensaios para a proliferação celular, exemplificados por ensaios de "morte celular" aqui descritos,

medem a viabilidade celular. Um destes ensaios é o Ensaio Luminescente à Viabilidade Celular CellTiter-Glo™, que está comercialmente disponível em Promega (Madison, WI). Esse ensaio determina o número de células viáveis em cultura à base da quantificação de ATP presente, que é uma indicação de células metabolicamente activas. Veja-se Crouch *et al.* (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, Pat. US 6602677. O ensaio pode ser conduzido no formato de 96 ou 384 poços, o que o torna susceptível a rastreio automático de alto rendimento (HTS). Veja-se Cree *et al.* (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. O procedimento do ensaio envolve a adição de um único reagente (Reagente CellTiter-Glo®) directamente às células em cultura. Isto resulta na lise das células e na geração de um sinal luminescente produzido por uma reacção da luciferase. O sinal luminescente é proporcional à quantidade de ATP presente, que é directamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cultura. Os resultados podem ser registados por um luminómetro ou um dispositivo de imagiologia com câmara CCD. A produção de luminescência é expressa como unidades relativas de luz (RLU).

Outro ensaio para a proliferação celular é o ensaio "MTT", um ensaio colorimétrico que mede a oxidação de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio a formazano pela redutase mitocôndrica. Tal como o ensaio CellTiter-Glo™, este ensaio indica o número de células metabolicamente activas presentes numa cultura celular. Veja-se, e.g., Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65:55-63, e Zhang *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:3877-3882.

Um anticorpo anti-STEAP-1 pode ser testado quanto à sua capacidade para induzir morte celular *in vitro*. Os ensaios à indução de morte celular são bem conhecidos na especialidade. Estes ensaios podem medir, e.g., a perda de integridade da membrana como indicado pela captação de iodeto de propídio (PI), azul de tripano (veja-se Moore *et al.* (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11), ou 7AAD. Num ensaio exemplificativo de captação de PI, as células são cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM): F-12 de Ham (50:50) suplementado com 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone) e 2 mM de L-glutamina. Assim, o ensaio é realizado na ausência de complemento e células imunitárias efectoras. As células são semeadas a uma densidade

de 3×10^6 por placa em placas de 100 x 20 mm e deixam-se fixar durante a noite. O meio é removido e substituído por meio fresco sozinho ou meio contendo várias concentrações do anticorpo ou do imunoconjungado. As células são incubadas durante um período de tempo de 3 dias. Após o tratamento, lavam-se as monocamadas com PBS e destacam-se por tripsinização. As células são então centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, a pelete é ressuspensa em 3 ml de tampão de ligação de Ca²⁺ (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) e dividida em aliquotas em 12 x tubos e 75 mm com tampas filtrantes de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubes por grupo de tratamento) para remoção de agregados celulares. Os tubos recebem então PI (10 µg/ml). As amostras são analisadas utilizando um citómetro de fluxo FACSCAN™ e software FACS CONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Os anticorpos ou imunoconjungados que induzem níveis estatisticamente significativos de morte celular como determinado pela captação de PI são assim identificados.

Um anticorpo ou um imunoconjungado anti-STEAP-1 podem ser testados quanto à sua capacidade para induzir apoptose (morte celular programada) *in vitro*. Um ensaio exemplificativo para anticorpos ou imunoconjungados que induzem apoptose é um ensaio de ligação a anexina. Num ensaio de ligação a anexina exemplificativo, as células são cultivadas e semeadas em placas como discutido no parágrafo precedente. O meio é removido e substituído por meio fresco sozinho ou meio contendo 0,001 a 10 µg/ml do anticorpo ou imunoconjungado. Após um período de incubação de três dias, as monocamadas são lavadas com PBS e destacadas por tripsinização. As células são depois centrifugadas, ressuspensas em tampão de ligação de Ca²⁺, e divididas em aliquotas em tubos como discutido no parágrafo anterior. Os tubos recebem então anexina marcada (e.g. anexina V-FITC) (1 µg/ml). As amostras são analisadas utilizando um citómetro de fluxo FACSCAN™ e software FACS CONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Os anticorpos ou imunoconjungados que induzem níveis estatisticamente significativos de ligação a anexina relativamente ao controlo são assim identificados. Outro ensaio exemplificativo para anticorpos ou imunoconjungados que induzem apoptose é um ensaio colorimétrico de ELISA de ADN e histona para a detecção de degradação internucleossómica de ADN genómico. Este ensaio pode ser realizado utilizando, e.g., o

kit de ELISA de Detecção de Morte Celular (Roche, Palo Alto, CA).

As células para utilização em qualquer dos ensaios *in vitro* anteriores incluem células ou linhas celulares que expressam naturalmente STEAP-1 ou que foram manipuladas para expressar STEAP-1. Estas células incluem células tumorais que sobre-expressam STEAP-1 relativamente a células normais do mesmo tecido de origem. Estas células também incluem linhas celulares (incluindo linhas celulares tumorais) que expressam STEAP-1, e linhas celulares que normalmente não expressam STEAP-1 mas foram transfectadas com ácido nucleico que codifica STEAP-1.

Um anticorpo anti-STEAP-1 ou um seu imunoconjugado podem ser testados quanto à sua capacidade para inibir o crescimento ou a proliferação celulares *in vivo*. Em determinadas concretizações, um anticorpo anti-STEAP-1 ou um seu imunoconjugado podem ser testados quanto à sua capacidade para inibir o crescimento tumoral *in vivo*. Podem ser utilizados para este teste sistemas modelo *in vivo*, tais como modelos de xenoenxerto. Num sistema de xenoenxerto exemplificativo, células tumorais humanas são introduzidas num animal não humano adequadamente imunocomprometido, *e.g.*, um rato SCID. Podem ser administrados ao animal um anticorpo ou um imunoconjugado da invenção. É medida a capacidade do anticorpo ou do imunoconjugado para inibir ou diminuir o crescimento tumoral. No sistema de xenoenxerto anterior, as células tumorais humanas podem ser células tumorais de um paciente humano. Estas células úteis para a preparação de modelos de xenoenxerto incluem linhas celulares tumorais humanas da próstata, do pulmão ou do cólon, que incluem, sem limitação, células PC3 que expressam STEAP-1 exógena, e células que expressam naturalmente STEAP-1 que incluem, sem limitação, células LnCAP (Southern Research Institute, Birmingham, AL), células LuCAP77 e células LuCAP35V (University of Washington, Seattle, WA). As células tumorais humanas podem ser introduzidas num animal não humano adequadamente imunocomprometido por injeção subcutânea ou por transplantação num local adequado, tal como uma almofada de gordura mamária.

Ensaios de ligação e outros ensaios

Um anticorpo anti-STEAP-1 pode ser testado quanto à sua actividade de ligação ao antigénio. Por exemplo, um anticorpo anti-STEAP-1 pode ser testado quanto à sua capacidade para se ligar a STEAP-1 exógena ou endógena expressa na superfície de uma célula. Pode ser utilizado para este teste um ensaio FACS.

Podem ser utilizados ensaios de competição para identificar um anticorpo monoclonal que compete com enxerto 120 ou suas variantes humanizadas, incluindo sem limitação, anticorpo 120v.24, pela ligação a STEAP-1. Este anticorpo competidor pode ligar-se ao mesmo epítopo (e.g., um péptido epitópico linear ou um epítopo conformacional formado por expressão de STEAP1 na superfície de uma célula) que é ligado pelo anticorpo enxerto 120, ou anticorpo enxerto 120 humanizado, incluindo a variante de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24. Os ensaios de competição exemplificativos incluem, mas não se lhes limitando, ensaios de rotina tais como os que são proporcionados em Harlow e Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch,14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). São proporcionados métodos exemplificativos detalhados para mapeamento de um epítopo ao qual um anticorpo se liga em Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", em *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Diz-se que dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo se cada um bloqueia a ligação do outro em 50% ou mais.

Num ensaio de competição exemplificativo, STEAP-1 imobilizada é incubada numa solução compreendendo um primeiro anticorpo marcado que se liga a STEAP-1 (e.g., anticorpo murino 120.545, anticorpo enxerto 120, ou anticorpo humanizado 120v.24) e um segundo anticorpo não marcado que está a ser testado quanto à sua capacidade para competir com o primeiro anticorpo pela ligação a STEAP-1. O segundo anticorpo pode estar presente num sobrenadante de hibridomas. Como controlo, STEAP-1 imobilizada é incubada numa solução compreendendo o primeiro anticorpo marcado mas não o segundo anticorpo não marcado. Após incubação sob condições permissivas para ligação do primeiro anticorpo a STEAP-1, o excesso de anticorpo não ligado é removido, e é medida a quantidade de marcador associado a STEAP-1 imobilizada. Se a quantidade de marcador associado a STEAP-1 imobilizada é substancialmente reduzida na amostra de

teste relativamente à amostra de controlo, então isso indica que o segundo anticorpo está a competir com o primeiro anticorpo pela ligação a STEAP-1. Uma STEAP-1 imobilizada está presente na superfície de uma célula ou numa preparação de membrana obtida de uma célula que expressa STEAP-1 na sua superfície.

Os anticorpos anti-STEAP-1 purificados podem ser adicionalmente caracterizados por uma série de ensaios incluindo, mas não se lhes limitando, sequenciação N-terminal, análise de aminoácidos, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) não desnaturante e de exclusão por tamanhos, espectrometria de massa, cromatografia de permuta iônica e digestão com papainá.

Numa concretização, a invenção contempla um anticorpo alterado que possui algumas, mas não todas, as funções efectoras, o que o torna um candidato desejável para muitas aplicações em que a semivida do anticorpo *in vivo* é importante ainda que certas funções efectoras (tais como complemento e ADCC) sejam desnecessárias ou prejudiciais. Em determinadas concretizações, as actividades de Fc do anticorpo são medidas para assegurar que apenas as propriedades desejadas são mantidas. Podem ser conduzidos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* para confirmar a redução/depleção de actividades de CDC e/ou ADCC. Por exemplo, podem ser conduzidos ensaios de ligação a receptores de Fc (FcR) para assegurar que o anticorpo não tem ligação a Fc R (portanto provavelmente não tem actividade de ADCC), mas retém capacidade de ligação a FcRn. As células principais para mediação de ADCC, as células NK, expressam Fc(RIII) apenas, enquanto os monócitos expressam Fc(RI), Fc(RII) e Fc(RIII). A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Um exemplo de um ensaio *in vitro* para determinar a actividade de ADCC de uma molécula de interesse está descrito nas Patentes U.S. 5,500,362 ou 5,821,337. As células efectoras úteis para estes ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células assassinas naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a actividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, e.g., num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Podem também ser realizados ensaios de ligação a Clq para confirmar

que o anticorpo é incapaz de se ligar a Clq e portanto não tem actividade de CDC. Para avaliar a activação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, e.g. como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Determinações da ligação a FcRn e de depuração/semivida *in vivo* podem também ser realizadas utilizando métodos conhecidos na especialidade.

EXEMPLOS

Seguem-se exemplos de métodos e composições da invenção. Está entendido que podem ser postas em prática várias outras concretizações, dada a descrição geral acima proporcionada.

Exemplo 1: Preparação de anticorpos anti-STEAP-1 humanizados

As moléculas de ácido nucleico que codificam variantes de sequência de aminoácidos do anticorpo, de fragmento de anticorpo, de domínio VL ou de domínio VH, são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na especialidade. Estes métodos incluem, mas não se lhes limitando, o isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácidos de ocorrência natural) ou a preparação por mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou dirigida ao local), mutagénese por PCR e mutagénese por cassetes, de uma variante anteriormente preparada ou uma versão não variante do anticorpo, fragmento de anticorpo, domínio VL ou domínio VH. Por exemplo, podem ser criadas bibliotecas encontrando posições de aminoácidos acessíveis de VL em VH, e opcionalmente numa ou mais CDR, para substituição de aminoácidos com aminoácidos variantes utilizando o método de Kunkel. Veja-se, e.g., Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* (1987), 154:367-382 e os presentes exemplos. A geração de sequências aleatórias é também descrita adiante nos Exemplos.

A sequência de oligonucleótidos inclui um ou mais dos conjuntos de codões desenhados para uma posição particular numa CDR (HVR) ou região FR de um polipéptido da invenção. Um conjunto de codões é um conjunto de diferentes sequências tripletos de nucleótidos utilizadas para codificar aminoácidos variantes desejados. Os conjuntos de codões podem ser representados utilizando símbolos para designar nucleótidos particulares ou misturas equimolares de nucleótidos como mostrado adiante de acordo com o código IUB.

CÓDIGOS IUB

G Guanina
A Adenina
T Timina
C Citosina
R (A ou G)
Y (C ou T)
M (A ou C)
K (G ou T)
S (C ou G)
W (A ou T)
H (A ou C ou T)
B (C ou G ou T)
V (A ou C ou G)
D (A ou G ou T)
N (A ou C ou G ou T)

Por exemplo, no conjunto de codões DVK, D pode ser os nucleótidos A ou G ou T; V pode ser A ou G ou C; e K pode ser G ou T. Este conjunto de codões pode apresentar 18 diferentes codões e pode codificar os aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly e Cys.

Conjuntos de oligonucleótidos ou iniciadores podem ser sintetizados utilizando métodos padrão. Um conjunto de oligonucleótidos pode ser sintetizado, por exemplo, por síntese em fase sólida, contendo sequências que representam todas as combinações possíveis de tripletos de nucleótidos proporcionadas pelo conjunto de codões e que codificarão o grupo desejado de aminoácidos. A síntese de oligonucleótidos com "degenerescência" de nucleótidos seleccionados em certas posições é bem conhecida na especialidade. Estes conjuntos de nucleótidos possuindo certos conjuntos de codões podem ser sintetizados utilizando sintetizadores comerciais de ácido nucleico (disponíveis, por exemplo, de Applied Biosystems, Foster City, CA), ou podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Portanto, um conjunto de oligonucleótidos sintetizado possuindo um conjunto particular de codões irá tipicamente incluir uma pluralidade de oligonucleótidos com diferentes sequências, as diferenças estabelecidas pelo conjunto de codões dentro da sequência

global. Os oligonucleótidos, como utilizado de acordo com a invenção, possuem sequências que permitem a hibridação com um molde de ácido nucleico do domínio variável e também podem incluir locais para enzimas restrição, para fins de clonagem.

Num método, podem ser criadas sequências de ácido nucleico que codificam aminoácidos variantes por mutagénese mediada por oligonucleótidos. Esta técnica é bem conhecida na especialidade como descrito por Zoller *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504. Resumidamente, são criadas sequências de ácido nucleico que codificam aminoácidos variantes por hibridação de um conjunto de oligonucleótidos que codificam os conjuntos desejados de codões com um molde de ADN, onde o molde é a forma de cadeia simples do plasmídeo contendo uma sequência molde de ácido nucleico da região variável. Após hibridação, é utilizada ADN-polimerase para sintetizar uma segunda cadeia complementar completa do molde que irá assim incorporar o oligonucleótilo iniciador, e irá conter os conjuntos de codões como proporcionado pelo conjunto de oligonucleótidos.

Geralmente, são utilizados oligonucleótidos de pelo menos 25 nucleótidos de comprimento. Um oligonucleótilo óptimo terá 12 a 15 nucleótidos que são completamente complementares ao molde de cada lado do(s) nucleótilo(s) que codificam para a(s) mutação(ões). Isto assegura que o oligonucleótilo irá hibridar correctamente com a molécula molde de ADN de cadeia simples. Os oligonucleótidos são prontamente sintetizados utilizando técnicas conhecidas na especialidade tais como a descrita por Crea *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

O molde de ADN é gerado pelos vectores que são derivados de vectores de bacteriófago M13 (os vectores M13mp18 e M13mp19 comercialmente disponível são adequados), ou pelos vectores que contêm uma origem de replicação fágica de cadeia simples como descrito por Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Assim, o ADN que se pretende mutar pode ser inserido num destes vectores de modo a gerar o molde de cadeia simples. A produção do molde de cadeia simples é descrita nas secções 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, acima.

Para alterar a sequência de ADN nativa, o oligonucleótilo é hibridado com o molde de cadeia simples sob condições de

hibridação adequadas. Uma enzima de polimerização de ADN, usualmente ADN-polimerase de T7 ou o fragmento de Klenow da ADN-polimerase I, é então adicionada para sintetizar a cadeia complementar do molde utilizando o oligonucleótido como iniciador para a síntese. É assim formada uma molécula de heterodúplex tal que uma cadeia de ADN codifica a forma mutada do gene 1, e a outra cadeia (o molde original) codifica a sequência nativa, não alterada, do gene 1. Esta molécula de heterodúplex é então transformada numa célula hospedeira adequada, usualmente um procariota tal como *E. coli* JM101. Após crescimento das células, estas são plaqueadas em placas de agarose e rastreadas utilizando o oligonucleótido iniciador radiomarcado com um 32-Fosfato para identificar as colónias bacterianas que contêm o ADN mutado.

O método descrito imediatamente acima pode ser modificado de modo a criar uma molécula de homodúplex em que ambas as cadeias do plasmídeo contêm a(s) mutação(ões). As modificações são as seguintes: O oligonucleótido de cadeia simples é hibridado com o molde de cadeia simples como descrito acima. Uma mistura de três desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) e desoxirribotimidina (dTTP), é combinada com uma tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que pode ser obtida de Amersham). Esta mistura é adicionada ao complexo molde-oligonucleótido. Após a adição de ADN-polimerase a esta mistura, é gerada uma cadeia de ADN idêntica ao molde excepto quanto a bases mutadas. Em adição, esta nova cadeia de ADN irá conter dCTP-(aS) em vez de dCTP, que serve para a proteger da digestão por endonucleases de restrição. Após a cadeia molde do heterodúplex de cadeia dupla ser cortada com uma enzima de restrição apropriada, a cadeia molde pode ser digerida com nuclease ExoIII ou outra nuclease apropriada depois da região que contém o(s) local(ais) que vão sofrer mutagénese. A reacção é então parada para deixar uma molécula que é apenas parcialmente de cadeia simples. É então formado um homodúplex de ADN completo de cadeia dupla utilizando ADN-polimerase na presença de todos os quatro desoxirribonucleótido-trifosfatos, ATP e ADN-ligase. Esta molécula de homodúplex pode então ser transformada numa célula hospedeira adequada.

Como indicado previamente, a sequência do conjunto de oligonucleótidos tem comprimento suficiente para hibridar com o molde de ácido nucleico e pode também conter, embora não necessariamente, locais de restrição. O molde de ADN pode ser gerado pelos vectores que são derivados de vectores de bacteriófago M13 ou vectores que contêm uma origem de replicação fágica de cadeia simples como descrito por Viera *et al.* ((1987) *Meth. Enzymol.*, 153:3). Assim, o ADN que se pretende mutar tem que ser inserido num destes vectores de modo a gerar o molde de cadeia simples. A produção do molde de cadeia simples está descrita nas secções 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, *supra*.

De acordo com outro método, pode ser gerada uma biblioteca proporcionando a montante e a jusante conjuntos de oligonucleótidos, em que cada conjunto possui uma pluralidade de oligonucleótidos com sequências diferentes, sendo as diferentes sequências estabelecidas pelos conjuntos de codões proporcionados no interior da sequência dos oligonucleótidos. Os conjuntos de oligonucleótidos a montante e a jusante, juntamente com uma sequência molde de ácido nucleico de domínio variável, podem ser utilizados numa reacção em cadeia pela polimerase para gerar uma "biblioteca" de produtos de PCR. Os produtos de PCR podem ser referidos como "cassetes de ácido nucleico", pois podem ser fundidos com outras sequências de ácido nucleico relacionadas ou não relacionadas, por exemplo, proteínas do revestimento viral e domínios de dimerização, utilizando técnicas de biologia molecular estabelecidas.

Os conjuntos de oligonucleótidos podem ser utilizados numa reacção em cadeia pela polimerase utilizando uma sequência de molde de ácido nucleico de domínio variável como molde para criar cassetes de ácido nucleico. A sequência do molde de ácido nucleico de domínio variável pode ser qualquer porção das cadeias pesadas de imunoglobulina contendo as sequências de ácido nucleico alvo (ie., sequências de ácido nucleico que codificam aminoácidos alvo para substituição). A sequência do molde de ácido nucleico de região variável é uma porção de uma molécula de ADN de cadeia dupla possuindo uma primeira cadeia de ácido nucleico e uma segunda cadeia de ácido nucleico complementar. A sequência do molde de ácido nucleico de domínio variável contém pelo menos uma porção de um domínio variável e possui pelo menos uma CDR. Em alguns casos, a sequência do molde de ácido nucleico de domínio variável contém mais do que uma

CDR. Uma porção a montante e uma porção a jusante da sequência do molde de ácido nucleico de domínio variável podem ser alvos para hibridação com membros de um conjunto de oligonucleótidos a montante e um conjunto de oligonucleótidos a jusante.

Um primeiro oligonucleótido do conjunto de iniciadores a montante pode hibridar com a primeira cadeia de ácido nucleico e um segundo oligonucleótido do conjunto de iniciadores a jusante pode hibridar com a segunda cadeia de ácido nucleico. Os iniciadores oligonucleotídicos podem incluir um ou mais conjuntos de codões e ser desenhados para hibridar com uma porção da sequência do molde de ácido nucleico de região variável. A utilização destes oligonucleótidos pode introduzir dois ou mais conjuntos de codões no produto da PCR (*i.e.*, a cassette de ácido nucleico) após a PCR. O iniciador oligonucleótido que hibrida com regiões da sequência de ácido nucleico que codificam o domínio variável do anticorpo inclui porções que codificam resíduos de CDR que são alvos para substituição de aminoácidos.

Os conjuntos de oligonucleótidos a montante e a jusante podem também ser sintetizados para incluírem locais de restrição no interior da sequência oligonucleotídica. Estes locais de restrição podem facilitar a inserção das cassetes de ácido nucleico (*i.e.*, produtos da reacção PCR) num vector de expressão possuindo uma sequência de anticorpo adicional. Numa concretização, os locais de restrição são desenhados para facilitar a clonagem das cassetes de ácido nucleico sem introduzir sequências de ácido nucleico estranhas ou remover sequências de ácido nucleico de CDR ou de esqueleto originais.

As cassetes de ácido nucleico podem ser clonadas em qualquer vector adequado para expressão de uma porção ou da totalidade da sequência da cadeia leve ou pesada contendo as substituições de aminoácidos alvo geradas por via da reacção PCR. De acordo com métodos detalhados na invenção, a cassette de ácido nucleico é clonada num vector que permite a produção de uma porção ou da totalidade da sequência da cadeia leve ou pesada fundida com a totalidade ou uma porção de uma proteína do revestimento viral (*i.e.*, criando uma proteína de fusão) e exibida na superfície de uma partícula ou de uma célula. Embora estejam disponíveis e possam ser utilizados na prática da presente invenção vários tipos de vectores, os vectores

fagemídicos são os vectores preferidos para utilizar aqui, pois podem ser construídos com relativa facilidade, e podem ser prontamente amplificados. Os vectores fagemídicos geralmente contêm uma variedade de componentes incluindo promotores, sequências de sinal, genes de selecção fenotípica, locais de origem de replicação, e outras componentes necessárias como é conhecido pelas pessoas competentes na matéria.

Quando se pretende expressar uma combinação de aminoácidos variante particular, a cassete de ácido nucleico contém uma sequência que é capaz de codificar a totalidade ou uma porção do domínio variável da cadeia pesada ou leve, e é capaz de codificar as combinações de aminoácidos variantes. Para a produção de anticorpos contendo estes aminoácidos variantes ou combinações de aminoácidos variantes, como numa biblioteca, as cassetes de ácido nucleico podem ser inseridas num vector de expressão contendo uma sequência de antícorpo adicional, por exemplo a totalidade ou porções dos domínios variáveis ou constantes das regiões variáveis da cadeia leve e pesada. Estas sequências de antícorpo adicionais podem também ser fundidas a outras sequências de ácidos nucleicos, tais como sequências que codificam proteínas do revestimento viral e portanto permitem a produção de uma proteína de fusão.

A humanização de antícorpo murino anti-STEAP-1 humana é aqui descrita.

Materiais e Métodos

Os números dos resíduo estão de acordo com Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). São utilizadas as abreviaturas dos aminoácidos de letra única. As degenerescências do ADN estão representadas utilizando o código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T) .

Clonagem de domínios variáveis de 120 murino e geração de um antícorpo 120 quimérico - ARN total foi extraído de células de hibridoma produtoras de M2-120.545 (aqui designado por "120 murino" ou "mul20") utilizando métodos padrão. Os domínios variável leve (VL) e variável pesado (VH) foram amplificados

utilizando RT-PCR com iniciadores degenerados nas cadeias pesadas e leves. Os iniciadores directos eram específicos para a sequência de aminoácidos N-terminal das regiões VL e VH. Respectivamente, os iniciadores inversos LC e HC foram desenhados para hibridar com uma região no domínio constante leve (CL) e no domínio 1 constante pesado (CH1), que são altamente conservados entre as espécies. Os VL e VH amplificados foram clonados em vectores de expressão de mamífero. A sequência polinucleotídica das inserções foi determinada utilizando métodos de sequenciação de rotina. As sequências de aminoácidos de VL e VH de M2-120.545 ("mu 120") estão apresentadas nas Figuras 2A e 2B, respectivamente.

Geração de quimera 120 murino - Foi preparado um anticorpo anti-STEAP-1 quimérico por fusão das regiões variável pesada (VH) e variável leve (VL) de 120 murino com os domínios constantes de uma IgG humana. O anticorpo resultante é designado aqui "quimera 120," "120 quimera", "IgG 120 quimérica", ou "Fc quimera".

Enxertos directos da região hipervariável no esqueleto de consenso humano aceitador - Variantes construídas durante a humanização de 120 murino foram avaliadas tanto como proteína na forma de uma IgG como na forma de um Fab exibido sobre fagos.

O fagemídeo utilizado para este trabalho é um vector de exibição de Fab-g3 monovalente e consiste em dois quadros de leitura abertos sob o controlo do promotor phoA. O primeiro quadro de leitura aberto consiste na sequência de sinal stII fundida com os domínios VL e CH1 da cadeia leve aceitadora e o segundo consiste na sequência de sinal stII fundida com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada aceitadora seguidos pela proteína do revestimento fágico menor P3.

Os domínios VL e VH de 120 murino foram alinhados com as sequências de consenso capa I de VL humana (huKI) e do subgrupo III de VH humana (huIII). Para preparar os enxertos de CDR, regiões hipervariáveis do anticorpo 120 murino foram enxertadas nos esqueletos aceitadores de huKI e huIII.

A regiões hipervariáveis do anticorpo 120 murino (mu120) foram manipuladas no esqueleto de consenso humano aceitador

para gerar o enxerto de CDR directo (aqui designado por "enxerto 120" ou "120 enxerto"). No domínio VL enxertaram-se as seguintes regiões no aceitador de consenso humano: posições 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3). No domínio VH, enxertaram-se as posições 26-35a (H1), 49-65 (H2) e 95-102 (H3). As sequências das regiões variáveis de cadeia leve e pesada do enxerto 120 estão apresentadas nas Figuras 2A-2B. As CDR (também designadas aqui por HVR) estão apresentadas em caixas (Figuras 2A-2B). Estas definições de CDR incluem as posições definidas pela hipervariabilidade da sua sequência (ref de Kabat), pela sua localização estrutural (ref de Chothia) e pelo seu envolvimento em contactos antigénio-anticorpo (MacCallum *et al.* *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

As variantes de enxerto directo expressas como Fab exibido sobre fagos ou como uma IgG foram geradas por mutagénese de Kunkel utilizando um oligonucleótido separado para cada região hipervariável. Os clones correctos foram determinados por sequenciação do ADN.

Geração de variantes fágicas de 120 humanizado - Foram geradas variantes 120 humanizadas na forma de Fab exibido sobre fagos por mutagénese de Kunkle. Adicionou-se um oligonucleótido fosforilado a 300 ng de molde de Kunkel em Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM num volume final de 10 µl. Hibridou-se a mistura a 90°C durante 2 min, a 50°C durante 5 min e depois arrefeceu-se em gelo. Preencheu-se então o molde hibridado por adição de 0,5 µl de ATP 10mM, 0,5 µl dos dNTP 10mM (10mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µl de DTT 100mM, 1 µl de tampão 10X TM (Tris 0,5 M, pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M), 80 U de ligase de T4, e 4 U de polimerase de T7 num volume total de 20 µl durante 2 h à temperatura ambiente. O produto preenchido e ligado foi depois transformado em células XL1-blue (Stratagene). Os clones correctos foram identificados por sequenciação de ADN.

Os clones fágicos correctos foram crescidos em 25 ml de 2YT contendo 50 µg/ml de carbenacilina e fago auxiliar M13/KO7 (MOI 10) durante a noite a 37°C.

Avaliação de variantes de 120 humanizado - Variantes humanizadas expressas como IgG foram avaliadas por análise FACS

utilizando linhas celulares positivas (293 Steap1 NT LB50) e negativas (293 vector S408) para Steap1.

As variantes humanizadas expressas na forma de um Fab exibidos sobre fagos foram também avaliadas por análise FACS. Os fagos que expressam variantes de Fab foram primeiro avaliados quanto ao seu nível de exibição de Fab utilizando um ELISA de fagos utilizado para detectar um marcador flag fundido com a cadeia leve do Fab. Revestiram-se placas de microtípulo MaxiSorp com anti-gD 1766 a 10 µg/ml em PBS durante uma noite e depois bloquearam-se com bloqueador de Caseína. Os fagos dos sobrenadantes da cultura foram diluídos em série em PBST contendo 0,5% de BSA numa placa de microtípulo de cultura de tecidos e foram transferidos para os poços revestidos durante 1 h para capturar o fago de exibição de Fab. A placa foi lavada com PBST e adicionou-se anti-M13 conjugado com HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 em PBST contendo 0,5% de BSA) durante 40 min. Lavou-se a placa com PBST e desenvolveu-se por adição de substrato Tetrametilbenzidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Utilizou-se a absorbância a 405 nm como uma estimativa do nível de exibição de Fab na superfície dos fagos. As preparações de fagos foram normalizadas para exibição por diluição. Utilizaram-se os fagos de baixa exibição (e.g. a quimera) sem purificação para a análise FACS.

Para a análise FACS da ligação dos fagos, as células foram removidas da placa utilizando EDTA 2 mM, e foram recolhidas num tubo de fundo cônico de 15 mL e sedimentadas por centrifugação. As células (5×10^5 células por amostra) foram ressuspensas em 100 µL de fagos (normalizados por nível de exibição) em tampão de FACS (FBS a 1%, PBS com EDTA 2 mM) e incubadas durante 1-2 horas em gelo. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação. Adicionou-se anticorpo anti-M13 5G7 de controlo (Genentech, Inc. South San Francisco, CA) a 2 µg/mL e incubou-se em gelo durante pelo menos 45 minutos. Lavaram-se as amostras duas vezes com tampão de FACS por centrifugação. Adicionou-se uma diluição de 1:200 de PE anti-ratinho (Fragmento Fcy de cabra anti-IgG de ratinho com R-ficoeritrina, Jackson Immunoresearch) e incubou-se em gelo durante 30 minutos. As amostras foram novamente lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação e analisadas por FACS.

For a análise de IgG por FACS, as células foram preparadas como na FACS dos fagos. Cada IgG foi adicionada a 5 µg/mL em gelo durante 1 hora. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação e adicionou-se uma diluição de 1:200 de conjugado de PE anti-humano (Fragmento Fcγ anti-IgG humana de cabra com R-ficoeritrina, Jackson Immunoresearch) durante 30 minutos. As amostras foram novamente lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação e as amostras foram analisadas por FACS.

Produção de IgG e Determinação da Afinidade - A IgG foi purificada por cromatografia de afinidade com Proteína G. As determinações da afinidade foram realizadas por análise Scatchard em células 293 STEAP-1 NT LB50.

Resultados e Discussão

Desenho de enxerto de atribuição de CDR e sequências do domínio variável de 120 murino - O esqueleto aceitador humano utilizado para a humanização de M2-120.545 é baseado no domínio de consenso de VL capa I humano e no domínio de consenso de VH do subgrupo III humano. Os domínios VL e VH de M2-120.545 murino foram, cada um, alinhados com os domínios humanos capa I e subgrupo III; cada região de complementaridade (CDR) foi identificada e enxertada no esqueleto aceitador humano para gerar um enxerto de CDR que podia ser exibido na forma de um Fab em fagos e expresso na forma de uma IgG. As sequências de regiões variáveis de anticorpo humanizado anti-STEAP-1 versão 24 estão apresentadas nas Figuras 2A e 2B. O Fab de enxerto 120 exibido em fagos e a IgG de enxerto 120 foram testados quanto a ligação a células que expressam STEAP-1 exógena (293 STEAP-1 NT LB50) por análise FACS. Embora a IgG de enxerto 120 se ligasse especificamente às células que expressam STEAP-1, o sinal de FACS observado para a IgG de enxerto 120 foi inferior ao observado para a IgG 120 quimérica indicando uma perda na afinidade de ligação. A exibição em fagos do Fab de enxerto 120 também gerou um sinal de FACS que foi apenas observado em células que expressam STEAP-1. O desvio foi inferior ao observado para a IgG 120 quimérica. A análise Scatchard da IgG de enxerto 120 também indicou uma perda significativa (aproximadamente 50 vezes) na afinidade de ligação ($KD = 36 \text{ nM}$ para o 120v.78; $KD = 260 \text{ nM}$ para o enxerto 120).

Humanização de M2-120.545 – Aproximadamente 30 posições de vernier que influenciam a conformação das CDR e o empacotamento do domínio VL:VH foram identificadas e as alterações nestas posições entre os esqueletos dador e humano deverão ser consideradas aquando da humanização de anticorpos (Foote, J. e Winter, G., *J. Mol. Biol.*, 224(2):487-499 (1992)). Uma avaliação do alinhamento de M2-120.545 murino com o domínio VL capa I humano de consenso e o domínio VH do subgrupo III humano de consenso revelou diferenças de sequência em 6 posições de vernier chave no domínio VH: 24, 37, 48, 67, 73, 78 (veja-se a Figura 2B). Para avaliar a influência destas posições, resíduos de murino foram individualmente introduzidos no domínio VH do subgrupo III humano de consenso do Fab sobre o fago. Isto envolveu efectuar as seguintes mutações no Fab de enxerto 120 exibido no fago individualmente: A24V (120.v24), V37I (120.v37), V48M (120.v48), F67I (120.v67), e L78F (120.v78). A N73T não foi testada. Cada variante de fago foi normalizada por diluição até um nível de exibição de Fab equivalente determinado pela titulação de um marcador epítópico fundido à cadeia leve exibida no fago e depois avaliada quanto a ligação a STEAP-1 por análise FACS em células que expressam STEAP-1 (293 STEAP-1 NT LB50) e células que não a expressam (293 vector S408). O termo "2.ário" refere-se ao anticorpo secundário na análise FACS. O termo " -120" refere-se ao anticorpo anti-STEAP-1 120 murino. O termo " -10H1" refere-se a um anticorpo de controlo. Os termos "Fago 24" e "fago 37" referem-se a variantes anti-STEAP-1 humanizadas como aqui divulgado exibidas em fagos. "fago Ch 120" refere-se à quimera 120 exibida num fago, e "fago enxerto 120" refere-se ao enxerto 120 exibido num fago (Figura 6). A importância da normalização de clones fágicos pelo seu nível de exibição de Fab é ilustrada pela análise FACS do enxerto 120 e diferentes títulos de fago: 7×10^{12} fagos/ml na Figura 6 e 2×10^{11} fagos/ml na Figura 6. Após diluição para a menor concentração de fagos, o fago de enxerto 120 já não produziu um desvio de FACS observável. Assim, a normalização dos diferentes clones fágicos quanto ao seu nível de exibição foi um passo importante para a avaliação das suas diferenças de afinidade em relação a Steapl.

Após a normalização quanto aos níveis de exibição de Fab, a variante do enxerto 120 contendo a mutação adicional A24V (120.v24) produziu um desvio em FACS superior às outras

variantes (Figura 6). Quando expresso na forma de uma IgG, o 120.v24 produziu um desvio em FACS similar ao do anticorpo 120 quimérico em todas as concentrações testadas. A subsequente análise Scatchard de 120.v24 indicou uma Kd de 2,2 nM para a ligação a células 293 STEAP-1 NT LB50, uma melhoria de duas vezes em relação à quimera 120 e ao M2-120.545 murino original (Tabela 2).

Tabela 2: Afinidade de ligação de anticorpo anti-STEAP-1 para com a STEAP-1 da superfície celular (Kd (nM))

Linha celular	MAb anti-STEAP-1 murino 120.545 nM	quimera 120	anti-STEAP-1 humanizado 120v.24
PC3-PS5.4 (STEAP-1 exógena)	17,5 nM 187 256 locais por célula	9,9 nM 103 204 locais por célula	---
293.LB50 (STEAP-1 exógena)	4,7 nM 301 100 locais por célula	4,9 nM 252 892 locais por célula	2,2 nM 264 172 locais por célula
LNCaP-BR (STEAP-1 endógena)	1,5 nM 37 207 locais por célula	0,9 nM 22 021 locais por célula	---

A actividade de ligação de anticorpos anti-STEAP-1 nus, de 120 murino e quimera 120 foi também testada utilizando análise FACS. A ligação foi comparada para STEAP-1 exógena em células 293 estáveis STEAP-1 NT LB50, células PC3 estáveis STEAP-1 PS5.4, e STEAP-1 endógena em células LNCaP. Os resultados estão também apresentados nas Fig. 7D-7F. Células NT LB50 que expressam STEAP-1 humana exógena na superfície celular foram preparadas por transformação estável de células 293 (ATCC CRL-1573) com ADN de STEAP-1 humana. Células PS5.4 que expressam STEAP-1 humana exógena na superfície celular foram preparadas por transformação estável de PC3 (ATCC CLL-1435) com ADN de STEAP-1 humana. Células LNCaP (ATCC CRL-1740) expressam STEAP-1 endogenamente.

Exemplo 2: Caracterização de anticorpos anti-STEAP-1

Os anticorpos anti-STEAP-1 (anticorpos nus e conjugados de anticorpo e fármaco aqui divulgados) foram caracterizados ou podem ser caracterizados de acordo com métodos padrão.

Ensaios à base de ELISA: O rastreio de anticorpo anti-STEAP-1 por ELISA é realizado como se segue, com todas as incubações efectuadas à temperatura ambiente. Placas de teste (Nunc Immunoplate) foram revestidas durante 2 horas com STEAP-1 purificada em tampão de carbonato de sódio 50 mM, pH 9,6, depois foram bloqueadas com albumina sérica bovina a 0,5% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 30 minutos, e depois foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST). Adicionaram-se sobrenadantes do anticorpo de teste e incubou-se duas horas com agitação, depois lavou-se quatro vezes com PBST. As placas foram desenvolvidas por adição de 100 µl/poço de uma solução contendo 10 mg de dicloridrato de o-fenilenodiamina (Sigma, #P8287) e 10 µl de uma solução de peróxido de hidrogénio a 30% em 25 ml de tampão de fosfato e citrato, pH 5,0, e incubou-se durante 15 minutos. A reacção é parada por adição de 100 µl/poço de ácido sulfúrico 2,5 M. Os resultados são obtidos por leitura das placas num leitor de placas de ELISA automático a uma absorbância de 490 nm.

Caracterização da ligação anti-STEAP-1 por análise Scatchard:

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard descrita em Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) utilizando técnicas padrão bem conhecidas na especialidade relevante. Veja-se também Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1947).

Exemplo 3: Produção de Conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 e fármaco

Produção de ADC anti-STEAP-1 com auristatina - Foram produzidos ADC anti-STEAP-1 por conjugação de anticorpos anti-STEAP-1 120.545 murino, quimera 120, enxerto 120 e variantes de esqueleto 120 humanizado com as seguintes porções de fármaco-ligante: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE, MC-MMAF, vc-MMAE e vc-MMAF, em que as porções fármaco-ligante e de e os métodos de fixação são aqui divulgados assim

como em WO 2004/010957, publicado em 5 de Fevereiro, 2004, WO2006/034488, publicado em 9 de Setembro, 2005, e em Doronina, S.O. et al., *Nature Biotechnol.* 21:778-784 (2003).

Antes da conjugação, os anticorpos foram parcialmente reduzidos com TCEP utilizando métodos padrão de acordo com a metodologia descrita em WO 2004/010957. Os anticorpos parcialmente reduzidos foram conjugados com as porções de fármaco-ligante anteriores utilizando métodos padrão de acordo com a metodologia descrita em Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 e US 2005/0238649 A1. Resumidamente, os anticorpos parcialmente reduzidos foram combinados com as porções de fármaco-ligante para permitir a conjugação das porções a resíduos de cisteína. As reacções de conjugação foram extintas, e os ADC foram purificados. A carga de fármaco (número médio de porções de fármaco por anticorpo) para cada ADC foi determinada por HPLC. Como aqui se utiliza, a componente ligante-fármaco de um ADC, "-MC-vc-PAB-MMAE" ou "-MC-vc-PAB-MMAF" é por vezes abreviada para "-vcMMAE" ou "-vcMMAF", e a componente "-MC-MMAF" é por vezes abreviada para "MCMMAF" ou "mcMMAF."

Produção de ADC anti-STEAP-1 com maitansinóide - Foram produzidos ADC anti-STEAP-1 por conjugação de anticorpos anti-STEAP-1, 120 murino, quimera 120, enxerto 120 e variantes de esqueleto 120 humanizado, com a porção de fármaco-ligante -smcc-DM1. Esta conjugação pode ser realizada de acordo com o método divulgado em WO 2005/037992 para a conjugação de anticorpo anti-HER2 Herceptin®.

Exemplo 4: Ensaio de Redução do Volume Tumoral In Vivo

Para testar a eficácia de anticorpos monoclonais anti-STEAP-1 conjugados com toxina ou não conjugados, quanto à capacidade para reduzir o volume tumoral *in vivo* e *in vitro*, foi empregue o seguinte protocolo.

Linhos de células de mamífero e xenoenxertos tumorais humanos: a 293 é uma linha de células de rim embrionário humano imortalizadas (referência ATCC: CRL1573), a PC-3 é uma linha celular de adenocarcinoma da próstata humano (referência ATCC: CRL1435) e a LNCaP é uma linha celular de carcinoma da próstata (ATCC CRL1740). Todas as células foram crescidas em meio de

Eagle modificado por Dulbecco com elevado teor de glucose e F12 de Ham 50/50 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2mM de glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina e cultivadas a 37°C em 5% de CO₂. As linhas celulares 293 e PC-3 estáveis foram geradas por transfecção (Fugene, Roche) com um vector dirigido por citomegalovírus que codifica ou STEAP1 de comprimento completo (LB50 e PS5.4, respectivamente) ou um vector vazio e foram seleccionadas em G418 a 400 µg/ml (Geneticin, Life Technologies). Os modelos de explante da próstata humana, LuCAP77 e LuCAP35V, foram obtidos da University of Seattle.

A expressão de STEAP-1 exógena e endógena na superfície celular foi demonstrada por imuno-histoquímica (IHC) e análise FACS como se segue. Anticorpos anti-STEAP-1 de ovelha e de ratinho (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) foram gerados contra um péptido amino-terminal intracelular de STEAP-1 (veja-se Hubert, R.S., Vivanco, I. et al., PNAS 25:14523-14528 (1999)). Os anticorpos monoclonais contra os domínios extracelulares de STEAP-1 (Agensys, Inc.) foram gerados por imunização de ratinhos com células 293T transientemente transfectadas com STEAP-1. Para a análise IHC, o anticorpo anti-STEAP-1 de ovelha primário foi utilizado para a detecção. Para a análise FACS, as células foram crescidas até 90% da confluência e removidas das placas utilizando EDTA 2 mM em PBS. As células foram lavadas e ressuspensas em tampão de FACS (PBS com 1% de BSA) e incubadas durante 60 minutos com anticorpos anti-STEAP1 à temperatura ambiente seguindo-se 60 minutos com o anticorpo secundário apropriado conjugado com ficoeritrina. A análise foi realizada num FACSScan (BD Biosciences). Para a imunofluorescência, as células foram crescidas em lâminas da câmara durante a noite e depois incubadas com anticorpo primário a 37°C durante 60 minutos. As células foram fixadas em paraformaldeído, bloqueadas em BSA a 1% e incubadas com o anticorpo secundário apropriado conjugado com fluoresceína.

Utilizaram-se modelos de xenoenxerto de cancro da próstata *in vivo* para testar a eficácia dos ADC anti-STEAP-1. Estes modelos incluíram a linha celular LNCaP humana (ATCC CRL-1740 ou Southern Research Institute, Birmingham, AL). Os modelos de explante da próstata incluíram LuCaP77 e LuCap35V (University of Washington, Seattle, WA). Cada modelo de explante de próstata

foi mantido por transplantes em série em ratinhos SCID-beige machos castrados (modelo independente de androgénios, LuCAP 35V) ou não castrados (modelo dependente de androgénios, LuCAP 77), de Charles River Lab. Os ratinhos não castrados receberam uma pelete de testosterona antes da implantação, enquanto a castração foi realizada pelo menos duas semanas antes da implantação do tumor para permitir que os níveis de testosterona atingissem o nadir. Quando os ratinhos dadores tinham tumores entre 800-1000 mm³, o tecido tumoral foi assepticamente removido e dissecado em pequenas peças implantáveis (aproximadamente 20 mm³) nos animais do estudo. O tumor é colocado num bolso no local do implante e a pele é fechada utilizando clipe cirúrgicos. Para o modelo da linha celular LNCaP, as células LNCaP crescidas *in vitro* foram injectadas subcutaneamente a 8-10 milhões de células por ratinho em matrigel a 50% em ratinhos SCID-beige machos que tinham recebido uma pelete de testosterona. Quando a dimensão média do tumor atingiu 100-200 mm³, agruparam-se aleatoriamente os animais em dez grupos de dez ratinhos cada e deu-se-lhes uma administração IV única de ADC de anticorpo de teste ou anticorpo de controlo (nu ou controlo). Em algumas experiências, foram administradas múltiplas doses de anticorpo de teste ou de controlo (vejam-se as Figuras 8A, 9, e 10). Em algumas experiências, foram administradas uma única dose de anticorpo teste e de controlo como observado nas Figuras 8B e 11. Quando o modelo de explante da próstata era LuCap 77, foi implantada uma pelete de testosterona nos ratinhos aproximadamente 3-7 dias antes da transplantação de tumor exógeno. Os tumores foram medidos duas vezes por semana durante 4 semanas, depois uma ou duas vezes por semana durante o restante tempo do estudo ou uma vez por semana ao longo de todo o estudo. Um volume tumoral significativamente inferior nos animais de teste ao longo do tempo foi considerado uma indicação de eficácia. Em alguns casos, o volume tumoral diminuiu significativamente desde o volume inicial e permaneceu baixo ao longo de todo o estudo. Os resultados estão representados em gráfico nas Figuras 8-11.

Conjugados anti-STEAP-1 com o fármaco auristatina reduzem o volume do tumor da próstata *in vivo*

A administração de anti-STEAP-1 murino 120-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg foi eficaz num modelo de xenoenxerto de tumor da próstata (células LNCaP-Ner). Utilizaram-se PBS e anti-gp120-

MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) como controlos. As doses foram administradas nos dias 0, 7 e 14. Veja-se a Figura 8A.

A administração de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) e anti-STEAP-1 quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) a ratinhos SCID beige transplantados com tumor LNCap-Ner (tratados com uma pelete de testosterona como aqui descrito) mostrou-se eficaz. Utilizaram-se veículo, anti-ambrósia-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) e anti-ambrósia-MC-MMAF (12 mg/kg) como controlos. As doses foram administradas nos dias indicados na Figura 8. Os resultados estão representados em gráfico na Figura 8B.

A administração de anticorpo anti-STEAP-1 quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) e anti-STEAP-1 quimera 120-MC-MMAF (6 mg/kg) mostrou-se eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige transplantados com células LNCaP. Foram administradas aos ratinhos três doses aproximadamente nos dias 15, 25 e 30 a 3 mg/kg (anti-STEAP-vcMMAE) ou 6 mg/kg (anti-STEAP-mcMMAF). Utilizaram-se anti-ambrósia-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) e anti-ambrósia-MC-MMAF (6 mg/kg) de controlo. Veja-se a Figura 9.

A administração de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado quimera 120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) mostrou-se eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID beige machos (dependente de androgénios) transplantados com células LuCap 77. Os controlos foram veículo e anti-ambrósia-MC-vc-PAB-MMAE. Foram administradas três doses a 3 mg/kg de anticorpos de teste e de controlo. Veja-se a Figura 10.

A administração de anticorpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg, anticorpo anti-STEAP-1 120v.24-MC-MMAF a 6 mg/kg e 12 mg/kg a ratinhos castrados SCID-beige transplantados com tumor da próstata LuCap35V mostrou-se eficaz relativamente aos controlos. A carga de fármaco foi de 3,1 por anticorpo. Os anticorpos de controlo foram anti-ambrósia-MC-MMAF administrado a 12 mg/kg, e anti-gp 120-MC-vc-PAB-MMAE administrado a 6 mg/kg. Veja-se a Figura 11.

Conjugados anti-STEAP-1 com o fármaco auristatina reduzem o volume do tumor da próstata in vitro

Realizaram-se ensaios de morte celular *in vitro* para avaliar a eficácia de conjugados anti-STEAP-1 com fármaco para inibir o crescimento e/ou matar células que expressam STEAP-1. Resumidamente, células que expressam STEAP-1 foram plaqueadas a aproximadamente 2000 células/poço numa placa de 96 poços e tratadas 24 horas mais tarde em duplicado com conjugado de fármaco e anticorpo. As placas foram incubadas durante 5-7 dias a 37°C e desenvolvidas com o kit ensaio da viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI, EUA). As células de teste incluíram células PS5.4 (células PC3 que expressam STEAP-1 exógena), células LB50 (células 293 que expressam STEAP-1 exógena), células PC3 transfectadas com vetor sozinho, células 293 transfectadas com vetor sozinho e células LNCaP que expressam STEAP-1 endógena. Os conjugados de anticorpo e fármaco testados incluíram anticorpo-MC-MMAF de controlo, anticorpo-vc-MMAE de controlo, anticorpo anti-STEAP-1 quimera 120-vc-MMAE, anticorpo anti-STEAP-1 quimera 120-MC-MMAF (dois lotes diferentes de material), e anticorpo anti-STEAP-1 quimera-vc-MMAF. Os resultados estão apresentados na Figura 14A-E.

Exemplo 5: Preparação de anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína para conjugação por redução e Reoxidação

Anticorpos monoclonais anti-STEAP-1 de comprimento completo, manipulados com cisteína, (TioMab) expressos em células CHO, são dissolvidos em borato de sódio 500 mM e cloreto de sódio 500 mM a cerca de pH 8,0 e reduzidos com um excesso de cerca de 50-100 vezes de TCEP 1 mM (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (Getz et al. (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante cerca de 1-2 h a 37°C. O TioMab reduzido é diluído e carregado numa coluna HiTrap S em acetato de sódio 10 mM, pH 5, e eluído com PBS contendo cloreto de sódio 0,3 M. O TioMab reduzido eluído é tratado com ácido desidroascórbico 2 mM (dhAA) a pH 7 durante 3 horas, ou sulfato de cobre aquoso 2 mM (CuSO_4) à temperatura ambiente durante a noite. A oxidação ao ar ambiente pode também ser eficaz. O tampão é trocado por eluição sobre resina Sephadex G25 e eluído com PBS com DTPA 1 mM. O valor de tiol/Ab é verificado por determinação da concentração de anticorpo reduzido a partir da absorvância a 280 nm da solução e a

concentração de tiol por reacção com DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) e determinação da absorbância a 412 nm.

Exemplo 6: Preparação de conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco por conjugação de anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína e intermediários fármaco-ligante

Após os procedimentos de redução e reoxidação do Exemplo 5, o anticorpo anti-STEAP manipulado com cisteína é dissolvido em tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato) e arrefecido em gelo. Cerca de 1,5 equivalentes molares relativamente a cisteínas manipuladas por anticorpo de um intermediário fármaco-ligante de auristatina, tal como MC-MMAE (maleimidocaproílmonometilauristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE ou MC-val-cit-PAB-MMAF, com um grupo funcional reactivo com tiol tal como maleimido, são dissolvidos em DMSO, diluídos com acetonitrilo e água, e adicionados a anticorpo reduzido, reoxidado, arrefecido, em PBS. Após cerca de uma hora, é adicionado um excesso de maleimida para extinguir a reacção e rematar quaisquer grupos tiol do anticorpo que não reagiram. A mistura reaccional é concentrada por ultrafiltração centrífuga e o conjugado de fármaco e anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína é purificado e dessalinizado por eluição através de uma resina G25 em PBS, filtrado através de filtros de 0,2 µm sob condições estéreis, e congelado para armazenagem.

Através do procedimento acima, prepararam-se os seguintes conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco (onde a numeração para as variantes é a numeração normalizada de Kabat para a cadeia leve e a numeração EU para a cadeia pesada), como aqui proporcionado e na Figura 17):

tio humano 120-MC-MMAF por conjugação de cadeia leve V205C tio hu 120 e MC-MMAF;

tio humano 120-MC-MMAF por conjugação de cadeia pesada A118C tio hu 120 e MC-MMAF;

tio humano 120-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugação de cadeia leve V205C tio hu 120 e MC-val-cit-PAB-MMAE; e

tio humano 120-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugação de cadeia pesada A118C tio hu 120 e MC-val-cit-PAB-MMAE.

Exemplo 7: Caracterização de anticorpos anti-STEAP-1 manipulados com cisteína

Os conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco (TDC) preparados como descrito acima foram ensaiados para confirmar que retinham a actividade do anticorpo progenitor *in vitro*. Os TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (abreviado para huSteapl TDC (L205C) vcE e tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA 118C) (abreviado para huSteapl TDC (HCA118C) vcE) foram avaliados quanto a ligação a STEAP-1 por análise FACS em células que expressam (293 STEAP-1 NT LB50) e que não expressam (293 vector S408) STEAP-1. A expressão "2.º apenas" refere-se ao anticorpo secundário na análise FACS. O controlo de TDC (vcE) e o controlo ADC std (vcE) são conjugados de anticorpo de controlo tio e não-tio vc-PAB-MMAE e fármaco, respectivamente. O huSteapl ADC (std) é um conjugado de fármaco vc-PAB-MMAE derivado do anticorpo anti-STEAP-1 humano progenitor. Como mostrado, os TDC produziram desvios de FACS similares ao do huSteapl ADC progenitor.

Foram também realizados ensaios de morte celular *in vitro*, para avaliar a eficácia dos conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco para inibir o crescimento e/ou a morte de células que expressam STEAP-1. Resumidamente, células que expressam STEAP-1 foram plaqueadas a aproximadamente 2000 células/poço numa placa de 96 poços e foram tratadas 24 horas mais tarde em duplicado com conjugado de fármaco e anticorpo. As placas foram incubadas durante 5-7 dias a 37°C e desenvolvidas com o kit ensaio da viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI, EUA). As células de teste incluíram PS5.4 (células PC3 que expressam STEAP-1 exógena), LB50 (células 293 que expressam STEAP-1 exógena) e células LNCaP que expressam STEAP-1 endógena. Os conjugados de anticorpo e fármaco testados incluíram anticorpo-vc-MMAE de controlo (ADC std controlo (vcE)), tio anticorpo-vc-MMAE de controlo (TDC controlo (vcE)), os TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (abreviado para huSteapl TDC (L205C) vcE e tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) vcE), e huSteapl ADC (std), um conjugado de fármaco vc-PAB-MMAE derivado do anticorpo anti-STEAP-1 humano progenitor. Como mostrado nas Figuras 19A-C, os TCD anti-STEAP-1 retêm a actividade do ADC progenitor *in vitro*.

Exemplo 8: Ensaios de redução do volume tumoral *in vivo* para conjugados de anticorpo anti-STEAP-1 manipulado com cisteína e fármaco

Utilizaram-se modelos de xenoenxerto de cancro da próstata *in vivo* para testar a eficácia de ADC anti-STEAP-1 manipulados com cisteína. Estes modelos e os protocolos de teste empregues correspondiam aos descritos no Exemplo 4.

A administração do TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado para huSteap1 HC TDC vcE) (3 mg/kg) a ratinhos SCID beige transplantados com tumor LNCap-Ner (tratados com uma pelete de testosterona como aqui descrito) mostrou-se eficaz. Utilizaram-se veículo (PBS), anticorpo-vc-MMAE de controlo (ADC std ctrl vcE) e tio anticorpo-vc-MMAE de controlo (TDC HC ctrl vcE) como controlos. O efeito do TDC anti-STEAP-1 foi também comparado com o de anticorpo anti-STEAP-1 humano 120-MC-vc-PAB-MMAE (hu Steap1 std ADC vcE) como controlo positivo. Foi administrada uma única dose no dia 0. Todos os anticorpos foram administrados a 3 mg/kg. Os resultados estão representados em gráfico na Figura 20.

A Figura 21 mostra que a administração de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA 118C) (abreviado para huSteap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg e TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-MC-MMAF (HCA 118C) (abreviado para huSteap1 HC TDC mcF) a 1, 3 ou 6 mg/kg mostrou-se eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID-beige transplantados com células LNCaP. Foram administradas aos ratinhos doses únicas no dia 0 a 0, 3, 1 ou 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) ou 1, 3 ou 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF). Utilizaram-se como controlos veículo (PBS), o anticorpo-vc-MMAE de controlo (ADC std ctrl vcE) e tio anticorpo-vc-MMAE de controlo (TDC HC ctrl vcE).

A Figura 22 mostra que a administração de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado para huSteap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg e de TDC anti-STEAP-1 tio-humano 120-MC-MMAF (HCA1 18C) (abreviado para huSteap1 HC TDC mcF) a 3 ou 6 mg/kg se mostrou eficaz num modelo de xenoenxerto de cancro da próstata de ratinhos SCID beige machos (dependente androgénios) transplantados com células LuCap 35V. Foram administradas aos ratinhos doses únicas no dia 0 a 0, 3, 1 ou 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) ou 1, 3 ou 6 mg/kg (huSteap 1 HC

TDC mcF). Utilizaram-se como controlos veículo (PBS), anticorpo-vc-MMAE de controlo (ADC std ctrl vce) e tio anticorpo-vc-MMAE de controlo (TDC HC ctrl vce).

Exemplo 9: Preparação e caracterização do anticorpo anti-STEAP-1 SGIV a partir da variante 24 do anticorpo 120

Preparou-se outra variante de LC de anticorpo anti-STEAP-1 em que a cadeia leve e as regiões de esqueleto foram adicionalmente modificadas para obter níveis melhorados de expressão do anticorpo.

Materiais e Métodos

Os números dos resíduos estão de acordo com Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Utilizam-se as abreviaturas dos aminoácidos de letra única. As degenerescências do ADN estão representadas utilizando o código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

Preparação de uma Variante de Cadeia Leve Revista: Foi gerada e caracterizada uma variante do anticorpo 120.v24, designada "Simmons IV" ou simplesmente "SGIV". A sequência de aminoácidos da cadeia leve de SGIV está proporcionada em SEQ ID NO:90. Esta sequência, alinhada com as regiões correspondentes do anticorpo mu 120 (SEQ ID NO:89) e do anticorpo 120.v24 (SEQ ID NO:91) está apresentada na Figura 23.

Avaliação da variante SGIV comparativamente com a variante 120.v24 - Avaliaram-se anticorpos SGIV e 120.v24, expressos na forma de IgG, por análise FACS utilizando as linhas celulares transformadas de forma estável positivas para Step1, 293 Step1 NT LB48, 293 Step1 NT LB50 e 293 Steapl NT LB53, assim como em células LNCaP, que expressam STEAP-1 endógena (Figura 28). As células foram preparadas como descrito no Exemplo 1. Cada IgG foi adicionada a 5 µg/mL em gelo durante 1 hora. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação e adicionou-se uma diluição de 1:200 de conjugado de PE anti-humano (Fragmento Fcγ anti-IgG humana de cabra com R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos. As

amostras foram novamente lavadas duas vezes com tampão de FACS por centrifugação e as amostras foram analisadas por FACS.

Determinação da Afinidade à Base de Scatchard da ligação de SGIV e 120.v24 a STEAP-1 - As afinidades de ligação dos anticorpos 120.v24 e Simmons IV ("SGIV") a STEAP-1 foram determinadas utilizando análise Scatchard de acordo com métodos padrão. A IgG foi purificada por cromatografia de afinidade em Proteína G. As determinações de afinidade foram realizadas por análise Scatchard em células PC-3-PS5.4, 293-LB50 e LNCaP-BR em duplicado. Os gráficos Scatchard de 120.v24 e SGIV em células LNCaP BR e em células 293.LB50 estão apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente. A tabela que compara as afinidades de ligação médias para o mu 1789, mu 120, quimera Fc, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 e tio-SGIV em células PC-3-PS5.4, 293-LB50 e LNCaP-BR, assim como em células 293 que expressam transientemente STEAP-1, está apresentada na Figura 27.

Mutagénese Dirigida ao Local de SGIV e 120.v24: Variantes dos anticorpos SGIV e 120.v24 foram preparadas utilizando protocolos padrão de mutagénese como descrito acima. A primeira classe de variantes resultou de mutagénese dirigida ao local em que resíduos particulares de Simmons IV ("SGIV") foram substituídos pelos resíduos correspondentes de 120.v24 para melhorar adicionalmente a afinidade de ligação. As variantes específicas produzidas, como apresentado na Figura 24, foram as seguintes:

- (1) LS.VLVH1, em que os resíduos 42 ("Q") e 43 ("P") foram modificados para "K" e "A" respectivamente (SEQ ID NO:92)
- (2) LS.VLVH2, em que o resíduo 3 ("V") foi modificado para "Q", os resíduos 42 ("Q") e 43 ("P") foram modificados para "K" e "A" respectivamente, e o resíduo 85 ("V") foi modificado para "T" (SEQ ID NO:93)
- (3) LS.Q, em que o resíduo 3 ("V") foi modificado para "Q" (SEQ ID NO:94)
- (4) LS.CH 1, em que o resíduo 15 ("L") foi modificado para "V" e o resíduo 83 ("V") foi modificado para "F" (SEQ ID NO:95)

Uma segunda classe de variantes foi gerada através de mutagénese dirigida ao local em que resíduos particulares de 120.v24 foram substituídos pelos resíduos correspondentes de

Simmons IV (SGIV) numa tentativa de melhorar os níveis de expressão do anticorpo. As variantes específicas, como apresentado na Figura 24, foram as seguintes:

- (1) ED.FW1, em que o resíduo 3 ("Q") foi modificado para "V"; o resíduo 9 ("S") foi modificado para "D"; o resíduo 12 ("S") foi modificado para "A"; o resíduo 13 ("A") foi modificado para "V"; o resíduo 15 ("V") foi modificado para "L"; o resíduo 17 ("D") foi modificado para "E"; o resíduo 19 ("V") foi modificado para "A"; e o resíduo 22 ("T") foi modificado para "N" (SEQ ID NO:96)
- (2) ED.FW2, em que os resíduos 42 ("K") e 43 ("A") de 120.v24 foram modificados para "Q" e "P", respectivamente (SEQ ID NO:97)
- (3) ED.FW3, em que o resíduo 60 ("S") foi modificado para "D"; o resíduo 80 ("P") foi modificado para "A"; o resíduo 83 ("F") foi modificado para "V"; e o resíduo 85 ("T") foi modificado para "V" (SEQ ID NO:98)
- (4) ED.all, em que o resíduo 3 ("Q") foi modificado para "V"; o resíduo 9 ("S") foi modificado para "D"; o resíduo 12 ("S") foi modificado para "A"; o resíduo 13 ("A") foi modificado para "V"; o resíduo 15 ("V") foi modificado para "L"; o resíduo 17 ("D") foi modificado para "E"; o resíduo 19 ("V") foi modificado para "A"; o resíduo 22 ("T") foi modificado para "N"; os resíduos 42 ("K") e 43 ("A") de 120.v24 foram modificados para "Q" e "P"; o resíduo 60 ("S") foi modificado para "D"; o resíduo 80 ("P") foi modificado para "A"; o resíduo 83 ("F") foi modificado para "V"; e o resíduo 85 ("T") foi modificado para "V" (SEQ ID NO:99)
- (5) ED.Pro, em que o resíduo 43 ("A") foi modificado para "P" e o resíduo 80 ("P") foi modificado para "A" (SEQ ID NO:100)
- (6) ED.pl, em que o resíduo 9 ("S") foi modificado para "D"; o resíduo 42 ("K") foi modificado para "Q" e o resíduo 60 ("S") foi modificado para "D" (SEQ ID NO:101)

Resultados e Discussão

Preparação de Anticorpo SGIV - As sequências da região variável de anticorpo anti-STEAP-1 versão 24 (120.v24) estão apresentadas nas Figuras 23 e 24 (SEQ ID NO:91). Utilizando mutagénese dirigida ao local, preparou-se outra variante denominada "Simmons IV" ou simplesmente "SGIV" utilizando

protocolos padrão de mutagénese como descrito acima. As Figuras 23 e 24 mostram a sequência da cadeia leve de SGIV em alinhamento com a de anticorpo mu 120 e 120.v24. Os títulos de várias colheitas de anticorpo SGIV estão apresentados na Figura 29.

Comparação da ligação de SGIV e 120.v24 a STEAP-1 utilizando FACs - A capacidade de ambos os anticorpos, 120.v24 e SGIV, se ligarem a STEAP-1 expressa na superfície celular foi medida utilizando FACs. A ligação de anticorpo a linhas celulares que expressam STEAP-1 exógena (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 e 293 STEAP-1 LB53) ou STEAP-1 endógena (LNCaP.Br) foi medida em duplicado; os resultados estão resumidos na Figura 28. Como apresentado na Figura 28, ambos os anticorpos foram capazes de se ligar a STEAP-1 em todas as quatro linhas celulares.

Afinidade de ligação do anticorpo SGIV a STEAP-1 e comparação com 120.v24 - As afinidades de ligação de SGIV e 120.v24 a STEAP-1 foram examinadas utilizando análise Scatchard. Os gráficos Scatchard de 120.v24 e SGIV em células LNCaP BR e células 293.LB 50 estão apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente. A tabela que compara as afinidades de ligação médias para os anticorpos mu 1789, mu 120, quimera Fc, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 e tio-SGIV em células PC-3-PS5.4, 293-LB50 e LNCaP-BR, assim como em células 293 que expressam transientemente STEAP-1, está apresentada na Figura 27. Os resultados indicam que a afinidade de ligação do anticorpo 120.v24 em células 293-LB50 e LNCaP.BR é cerca de 1,5 vezes a da variante SGIV.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Genentech, Inc.

<120> Anticorpos e Imunoconjugados e Suas Utilizações

<130> SMK/FP6826895

<140> EP

<141> 2007-10-26

<150> EP 07863572.9

<151> 2007-10-26

<150> PCT/US2007/082726

<151> 2007-10-26

<150> US 60/863,295

<151> 2006-10-27

<150> US 60/868,707

<151> 2006-12-05

<150> US 60/921,300

<151> 2007-03-30

<150> US 60/937,857

<151> 2007-06-29

<160> 137

<170> PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15

Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45

Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60

Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80

Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95

Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
 130 135 140
 Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
 145 150 155 160
 Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
 195 200 205
 Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
 210 215 220
 Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
 245 250 255
 Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
 260 265 270
 Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe
 290 295 300
 Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
 305 310 315 320
 Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys
 325 330 335
 Ser Gln Leu Asn
 340

<210> 2

<211> 340

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Ile Ser Asp Asp Val Thr Asn Pro Glu Gln Leu Trp Lys Met
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Gly Asn Leu Glu Asp Asp Ser Tyr Ser Thr Lys Asp Ser
 20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Gly Leu Ser His Leu Gln His
 35 40 45

Ala Val His Val Asp Ala Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
 50 55 60

Gln Glu Phe Phe Pro Asn Trp Arg Leu Pro Val Lys Val Ala Ala Ile
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Ile Ile Tyr
 85 90 95

Pro Leu Val Thr Ser Arg Glu Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
 100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ala Ile Thr Leu Leu Ala Leu
 115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Glu Leu Ala Ala Val Val Gln Leu Arg Asn Gly
 130 135 140

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro Pro Trp Leu Asp Arg Trp Met Leu Ala
 145 150 155 160

Lys Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 165 170 175

Val Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
 180 185 190

Leu Asn Trp Ala Tyr Lys Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
 195 200 205

Val Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
 210 215 220

Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
 225 230 235 240

Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
 245 250 255

Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Val His Ala Leu Val Phe
 260 265 270

Ala Trp Asn Lys Trp Val Asp Val Ser Gln Phe Val Trp Tyr Met Pro
 275 280 285

Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Thr Leu Val Leu Ile Cys
 290 295 300

Lys Ile Ala Leu Cys Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
 305 310 315 320

Arg Cys Gly Trp Glu Asp Val Ser Lys Ile Asn Arg Thr Glu Met Ala
 325 330 335

Ser Arg Leu Asn
 340

<210> 3

<211> 340

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 3

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Glu Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1 5 10 15Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
 20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
 35 40 45
 Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
 50 55 60
 Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
 85 90 95
 Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
 100 105 110
 Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
 115 120 125
 Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
 130 135 140
 Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
 145 150 155 160
 Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
 195 200 205
 Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
 210 215 220
 Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
 245 250 255
 Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
 260 265 270
 Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Val Val Val Leu Ile Phe
 290 295 300
 Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
 305 310 315 320
 Arg His Gly Trp Glu Asp Ile Thr Lys Ile Asn Lys Met Glu Ile Ser
 325 330 335
 Ser Gln Leu Asn
 340

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1														15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
														30	
Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
														45	
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
														60	
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr		
														80	
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
														95	
Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
														110	

Lys Arg

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1														15	

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Asp	Val	Gln	Val	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5				10				15			
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp															
20 25 30															
Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp
35					40						45				
Met Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu															
50 55 60															
Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
65					70			75			80				
Leu Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys															
85 90 95															
Ala	Arg	Glu	Arg	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
100					105				110						
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ala				
115					120				124						

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
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> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

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

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 32
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 37
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 39

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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
20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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
20 25 30

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71
Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr
20 25

<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72
Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 73
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73
Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ala Ser Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 78
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Arg Ile 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> 79
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Phe 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> 80
<211> 30
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 80
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 81
<211> 20
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético
<400> 81
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
Glu Asp Asp Phe
20

<210> 82
<211> 20
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético
<400> 82
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
Glu Asp Asp Phe
20

<210> 83
<211> 18
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético
<400> 83
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15
Asp Asp

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético
<400> 84
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 85
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 86

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 87

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
 35 40 45

Tyr Val Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 50 55 60

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 65 70 75 80

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 85 90 95

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 100 105 110

Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 115 120 125

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
 130 135 140

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 145 150 155 160

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 165

<210> 88

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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> 90
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 91
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 91

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

Lys Arg

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 92

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

<210> 93

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 93

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

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 94

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

<210> 95

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 95

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
					20			25						30	

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35				40						45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
					65			70		75				80	

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					85				90				95		

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
					100				105						

<210> 96

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 96

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
					20			25						30	

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
		35				40						45			

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
					65			70		75				80	

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

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
					100				105						

<210> 97

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 98

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 99

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipéptido sintético

<400> 99

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
				20				25						30	

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
					35			40				45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
					65			70		75				80	

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					85			90					95		

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
					100			105							

<210> 100

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 100

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
				20				25						30	

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
				35				40				45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
					65			70		75				80	

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					85				90				95		

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
					100			105							

<210> 101

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 101

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

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp	Lys	Met	Lys	Pro	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Leu
1				5					10					15

<210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
1				5					10			15			

Arg	Gly	Glu	Cys
		20	

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
1				5					10			15			

Arg	Gly	Glu	Cys
		20	

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 114

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35

<210> 115

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 116

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Pro Arg His Ala Asn Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 117

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 118

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 119

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Ile Ser Ile Ala Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 120

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 121

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
20 25 30

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 122

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
20 25 30

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 123

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 124

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
1 5 10 15

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
20 25 30

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 125

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 126

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 127

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 128

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 129

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 130

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 131

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 132

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 133

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 134

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 135

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

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

Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				20				25					30		

His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
				35			40				45				

<210> 136

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
				20			25					30			

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
				35			40				45				

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50		55			60					

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr		
				65			70			75		80			

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				85			90				95				

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
				100			105								

<210> 137

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg
				20			25					30			

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
				35			40				45				

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50		55			60					

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr		
				65			70			75		80			

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

Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
				100			105								

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleótido que codifica:

(i) um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo comprehende uma cadeia pesada (HC) comprendendo:

- (1) uma HVR-H1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14;
- (2) uma HVR-H2 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15;
- (3) uma HVR-H3 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; e
- (4) uma HC-FR1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25;

e uma cadeia leve (LC) comprehendendo:

- (1) uma HVR-L1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
- (2) uma HVR-L2 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; e
- (3) uma HVR-L3 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13,

em que, opcionalmente, a cadeia leve comprehende:

- (1) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:90;
- (2) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:91;
- (3) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:92;
- (4) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:93;
- (5) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:94;
- (6) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:95;
- (7) uma região de cadeia leve comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:96;

- (8) uma região de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:97;
- (9) uma região de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98;
- (10) uma região de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:99;
- (11) uma região de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:100; ou
- (12) uma região de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:101.

2. Polinucleótido da reivindicação 1(i), em que o anticorpo monoclonal comprehende adicionalmente pelo menos uma, duas ou três regiões de esqueleto (FR) de HC seleccionadas entre:

- (1) uma HC-FR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:22
- (2) uma HC-FR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:23; e
- (3) uma HC-FR4 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

3. Polinucleótido da reivindicação 1(i), em que:

- (i) o anticorpo monoclonal comprehende uma cadeia leve (LC) de SEQ ID NO:6 e/ou uma cadeia pesada (HC) de SEQ ID NO:10,
- (ii) o anticorpo é um fragmento de anticorpo seleccionado entre um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv ou (Fab')₂, ou
- (iii) o anticorpo é um anticorpo biespecífico.

4. Vector compreendendo o polinucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-3.

5. Célula hospedeira compreendendo o vector da reivindicação 4 ou o polinucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-3, em que opcionalmente a célula hospedeira é uma célula bacteriana, de levedura, de insecto ou eucariota.

6. Método de preparação de um anticorpo anti-STEAP-1, em que o método comprehende a) a cultura da célula hospedeira da

reivindicação 5 sob condições adequadas para expressão do polinucleotídeo que codifica o anticorpo, e b) o isolamento do anticorpo.

7. Anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo comprehende uma cadeia pesada (HC) comprendendo:

- (1) uma HVR-H1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14;
- (2) uma HVR-H2 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15;
- (3) uma HVR-H3 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; e
- (4) uma HC-FR1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25;

e uma cadeia leve (LC) comprehendendo:

- (1) uma HVR-L1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
- (2) uma HVR-L2 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; e
- (3) uma HVR-L3 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13,

e em que o anticorpo está covalentemente ligado a um marcador de detecção, um marcador de captura ou um suporte sólido, em que opcionalmente o marcador de detecção é seleccionado entre um radionuclido, um corante fluorescente, um corante quimioluminescente, uma porção de substrato que desencadeia bioluminescência, uma porção de substrato que desencadeia quimioluminescência e uma enzima.

8. Anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1 para utilização num método para obter a imagem de um tumor num indivíduo, comprehendendo a administração ao referido indivíduo do referido anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo comprehende uma cadeia pesada (HC) comprendendo:

- (1) uma HVR-H1 comprehendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14;

- (2) uma HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15;
 - (3) uma HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; e
 - (4) uma HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25;
- e uma cadeia leve (LC) compreendendo:
- (1) uma HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
 - (2) uma HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; e
 - (3) uma HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13,
- e a detecção do anticorpo ligado a STEAP-1, ou uma sua variante alélica de ocorrência natural, no referido indivíduo.

9. Anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1 para a utilização da reivindicação 8, em que o anticorpo está covalentemente ligado a um marcador de detecção, em que opcionalmente o marcador de detecção é seleccionado entre um radionuclido, um corante fluorescente, um corante quimioluminescente, uma porção de substrato que desencadeia bioluminescência, uma porção de substrato que desencadeia quimioluminescência e uma enzima.

10. Anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1 para a utilização da reivindicação 8, em que o tumor é um tumor da próstata, do pulmão, do cólon, da bexiga ou ovariano, ou sarcoma de Ewing.

11. Anticorpo manipulado com cisteína compreendendo um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a STEAP-1, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) compreendendo:

- (1) uma HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14;
- (2) uma HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:15;
- (3) uma HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16; e

(4) uma HC-FR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:25;

e uma cadeia leve (LC) compreendendo:

(1) uma HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11;

(2) uma HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12; e

(3) uma HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13,

em que um ou mais resíduos de aminoácido estão substituídos por um ou mais aminoácidos cisteína livre possuindo um valor de reactividade de tiol na gama de 0,6 a 1,0.

12. Imunoconjunto compreendendo o anticorpo manipulado com cisteína da reivindicação 11 covalentemente ligado a um agente citotóxico, em que opcionalmente o agente citotóxico é seleccionado entre uma toxina, um agente quimioterapêutico, uma porção de fármaco, um antibiótico, um isótopo radioactivo e uma enzima nucleolítica.

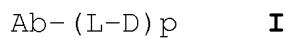
13. Anticorpo manipulado com cisteína da reivindicação 11 em que:

- (i) o anticorpo está covalentemente ligado a um marcador de captura, um marcador de detecção ou um suporte sólido, ou
- (ii) o anticorpo compreende uma cisteína em uma ou mais posições seleccionadas entre 15, 43, 110, 144, 168 e 205 da cadeia leve segundo a convenção de numeração de Kabat, e 41, 88, 115, 118, 120, 171, 172, 282, 375 e 400 da cadeia pesada segundo a convenção de numeração EU.

14. Conjunto anticorpo-fármaco:

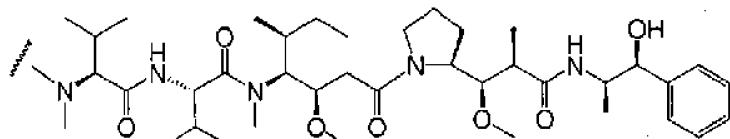
- (i) compreendendo o anticorpo manipulado com cisteína da reivindicação 11, em que o anticorpo está covalentemente ligado a uma porção de fármaco de auristatina ou maitansinóide, ou
- (ii) compreendendo o anticorpo manipulado com cisteína da reivindicação 11 (Ab), e uma porção de fármaco de auristatina ou maitansinóide (D), em que o anticorpo manipulado com cisteína está ligado através de um ou mais

aminoácidos cisteína livre, através de uma porção ligante (L), a D; o composto possuindo a Fórmula I:



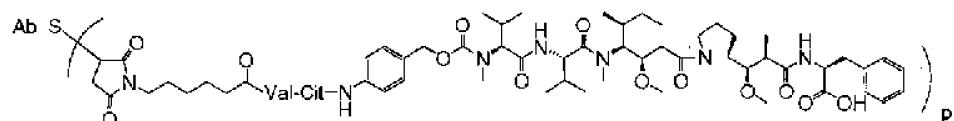
em que p varia de 1 a 4,

em que opcionalmente D é MMAE, possuindo a estrutura:

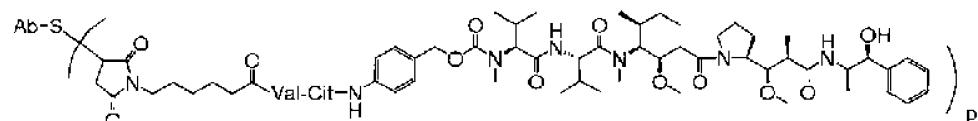


onde a linha ondulada indica o local de fixação ao ligante L, ou

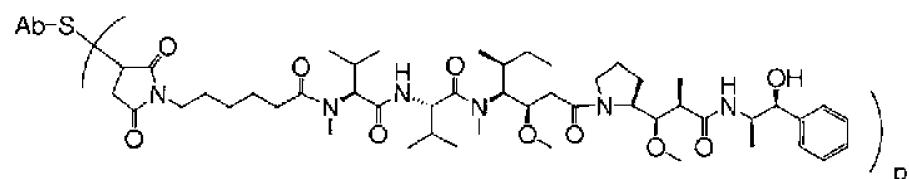
(iii) seleccionado entre as estruturas:



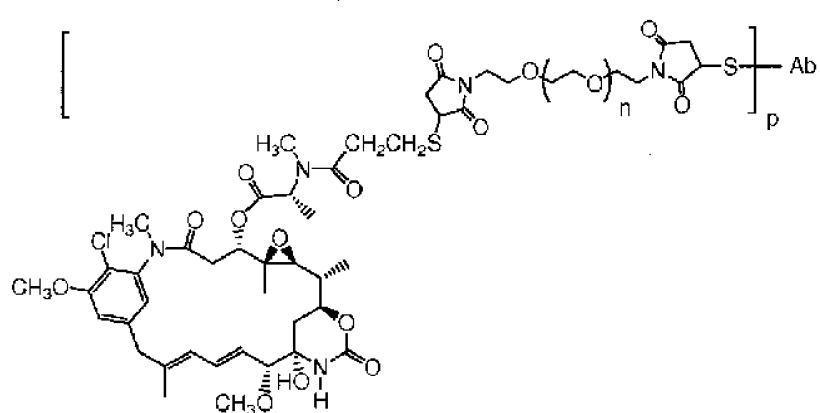
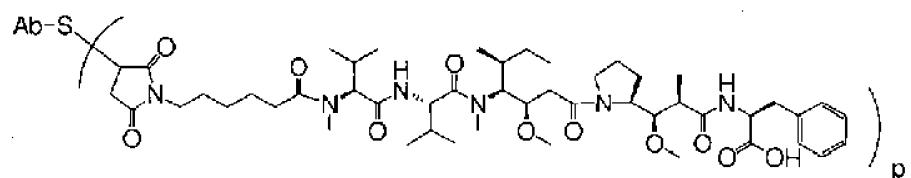
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB MMAE



Ab-MC-MMAE



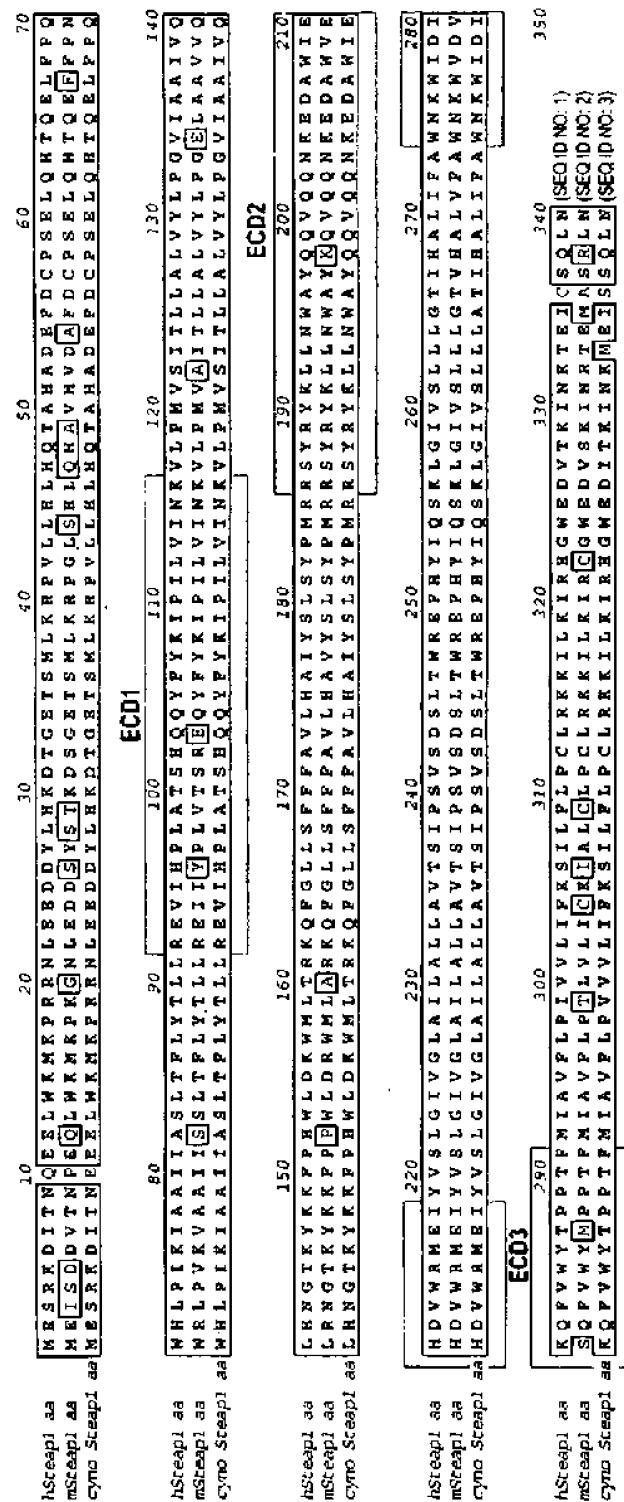
em que Val é valina; Cit é citrulina; p é 1, 2, 3 ou 4; e Ab é um anticorpo anti-STEAP-1 da reivindicação 11.

15. Formulação farmacêutica compreendendo o conjugado anticorpo-fármaco da reivindicação 14(i), e um diluente, transportador ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis.

16. Formulação farmacêutica da reivindicação 15 para utilização num método de tratamento do cancro da próstata, do pulmão ou do cólon, o método compreendendo a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz da formulação farmacêutica, em que opcionalmente é administrado ao paciente um agente quimioterapêutico em combinação com o composto conjugado anticorpo-fármaco, onde o agente quimioterapêutico é seleccionado entre letrozole, cisplatina, carboplatina, taxol, paclitaxel, oxaliplatina, doxetaxel, 5-FU, leucovorina, lapatinib e gencitabina.

Lisboa, 2015-05-12

Figura 1



Alinhamento de Sequências da Cadeia Leve

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
huKI	D Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q
mu120	D V M S Q S P S S L A V S V G E K V T M S C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q
Enxerto 120	D Q M T Q S P S S L S A S V G O R V T I T C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q
120.v24	D Q M T Q S P S S L S A S V G D O R V T I T C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q
	*
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
huKI	Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P
mu120	Q K P G S P K L L I Y W A S I R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V K A
Enxerto 120	Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P
120.v24	Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P
	*
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
huKI	E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:4)
mu120	E D L A V Y C Q Q Y N Y P R I F G G G T K V E I K R (SEQ ID NO:5)
Enxerto 120	E D F A T Y Y C Q Q Y N Y P R I F G G G T K V E I K R (SEQ ID NO:6)
120.v24	E D F A T Y Y C Q Q Y N Y P R I F G G G T K V E I K R (SEQ ID NO:6)
	*

Figura 2A

Alinhamento de Sequências da Cadeia Pesada

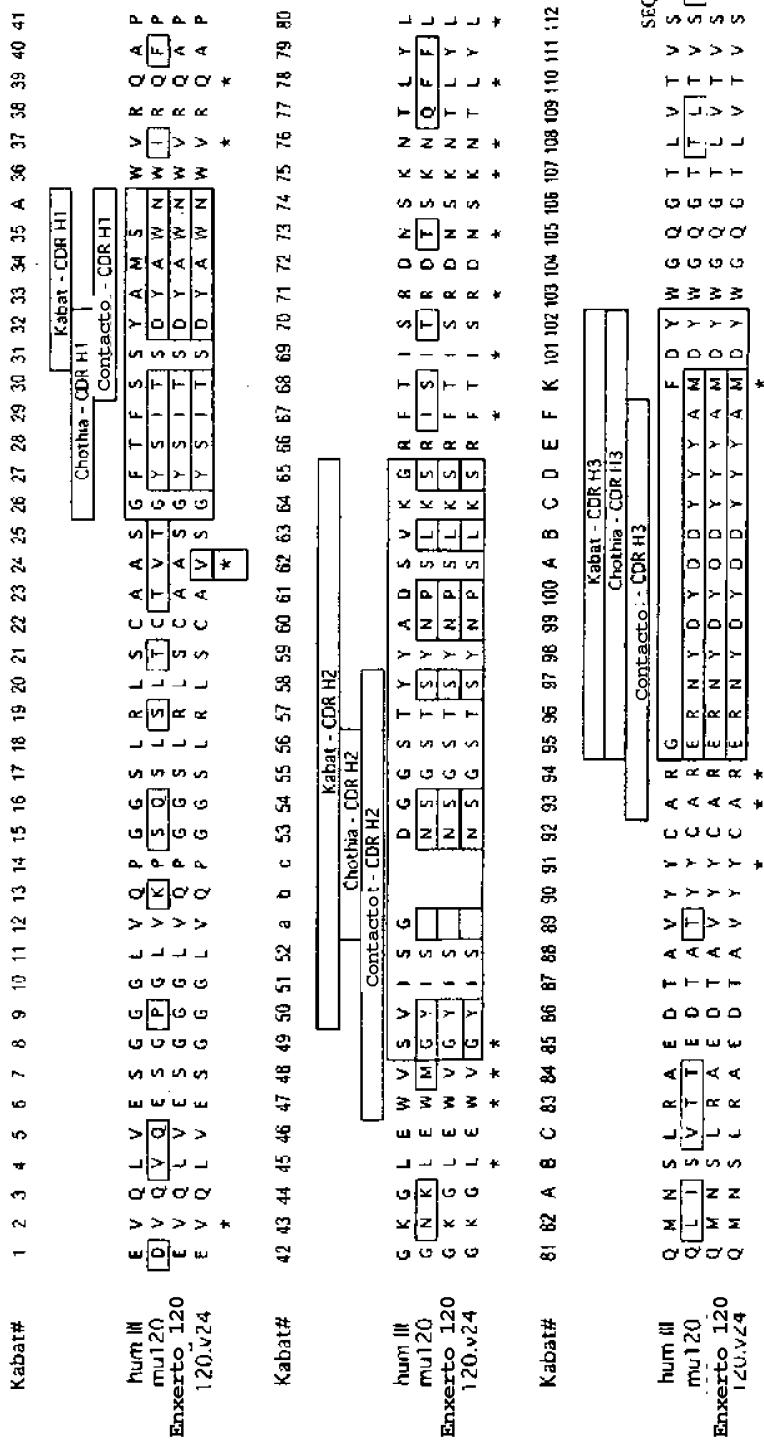


Figura 2B

I	A QVQLVQSGAEVKKPGASVKKVSKAS B QVQLVQSGAEVKKPGASVKKVSKAS C QVQLVQSGAEVKKPGASVKKVSKAS D QVQLVQSGAEVKKPGASVKKVSKAS	-H1- -H1- -H1- -H1-	WVRQAPGQGLEWMG WVRQAPGQGLEWM WVRQAPGQGLEWM WVRQAPGQGLEWM	-H2- -H2- -H2- -H2-
II	A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	-H1- -H1- -H1- -H1-	WIRQPPGKGLEWIG WIRQPPGKGLEWI WIRQPPGKGLEWI WIRQPPGKGLEWI	-H2- -H2- -H2- -H2-
III	A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1- -H1- -H1- -H1-	WVRQAPGKGLEWVS WVRQAPGKGLEWV WVRQAPGKGLEWV WVRQAPGKGLEWV	-H2- -H2- -H2- -H2-
<i>Acetilador-1</i>				
	A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1- -H1- -H1-	WVRQAPGKGLEWVS WVRQAPGKGLEWV WVRQAPGKGLEWV	-H2- -H2- -H2-
<i>Acetilador-2</i>				
	A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1- -H1- -H1- -H1-	WVRQAPGKGLEWVS WVRQAPGKGLEWV WVRQAPGKGLEWV WVRQAPGKGLEWV	-H2- -H2- -H2- -H2-

Figura 3A

SEQ ID NOS:							
RVTITADTSTSTAYMELSSLSLRSSEDTAVYYCAR	[]	-H3-		NGQGTLVTVSS	26, 27, 28, 29		
RVTITADTSTSTAYMELSSLSLRSSEDTAVYYCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	30, 31, 28, 29		
RVTITADTSTSTAYMELSSLSLRSSEDTAVYYCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	30, 31, 32, 29		
RVTITADTSTSTAYMELSSLSLRSSEDTAVYYCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	30, 31, 33, 29		
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	34, 35, 36, 29		
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	37, 38, 36, 29		
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	37, 38, 39, 29		
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	37, 38, 40, 29		
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	41, 42, 43, 29		
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 43, 29		
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 46, 29		
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 47, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	48, 42, 49, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 49, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 50, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	48, 42, 51, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 51, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 52, 29		
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA[V]YCAR	[]	-H3-		WGQGTLVTVSS	44, 45, 53, 29		

Figura 3B

kv1 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPDSRFSGSSGGTDFTLTISSLQP
 kv1 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPDSRFSGSSGGTDFTLTISSLQP
 kv2 DIVMTQSPSLPVTPGEPASIS C -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGSGTDFTLKISRVEA
 kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGSGTDFTLTISRLEP
 kv4 DIVMTQSPDSLAWSLGERATING -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGSGTDFTLTISSLQA

Figura 4A

EDFATYYC -L3- FGQGTTKVEIK	SEQ ID NOS: 54, 55, 56, 57
EDFATYYC -L3- FGQGTTKVEIK	SEQ ID NOS: 54, 58, 56, 57
EDVGVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	SEQ ID NOS: 58, 59, 60, 57
EDFAVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 57
EDVAVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	SEQ ID NOS: 64, 65, 66, 57

Figura 4B

	230	240	250	260	270	
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV					
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV					
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV					

	280	290	300	310	320	
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQEWLNGKEYKCKVSNKALP					
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALP					
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP					
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP					
	*	*	*	*	*	
	330	340	350	360	370	
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV D L					
humIgG2	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
humIgG3	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
humIgG4	SSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV ** *					
	*	*	*	*	*	
	380	390	400	410	420	
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMH					
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMH					
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMH					
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMH					
	*	*	*	*	*	
	430	440				
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:85)					
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:86)					
humIgG3	EALHNRFQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)					
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)					
	**	*				

Uma sequência de consenso da região constante da cadeia leve capa:

```

RTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:89)

```

Figura 5

Figura 6A

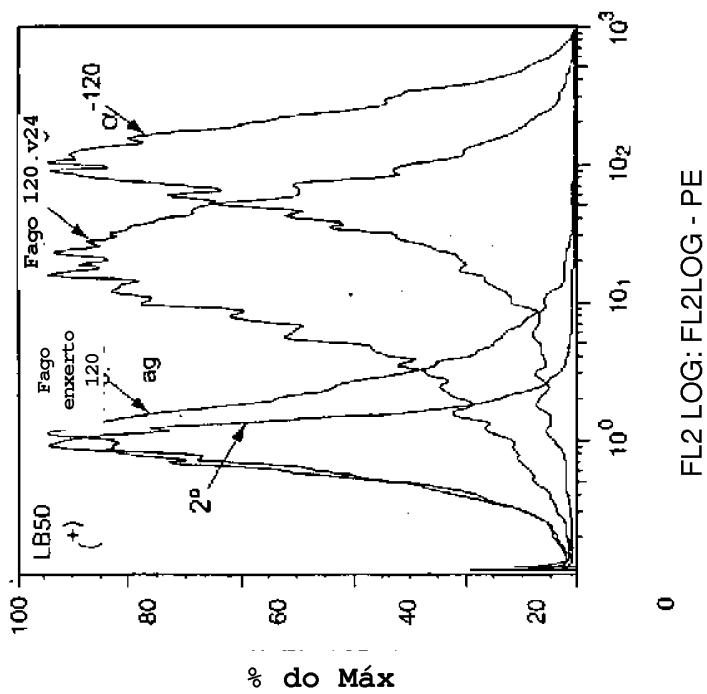


Figura 6B

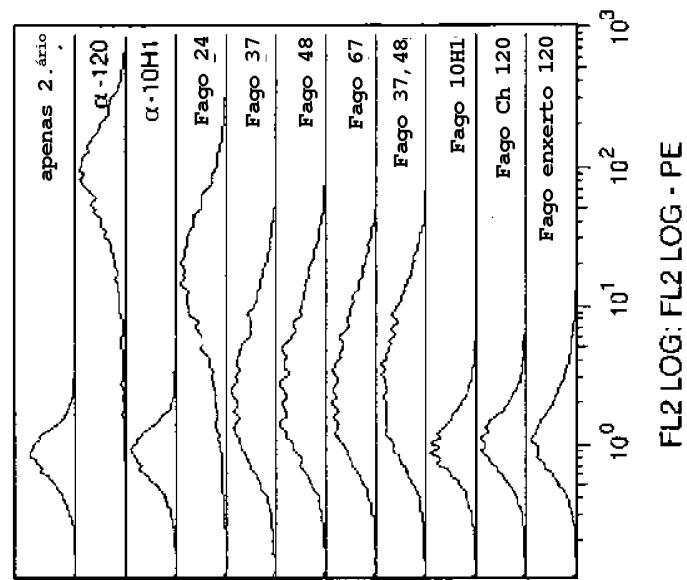
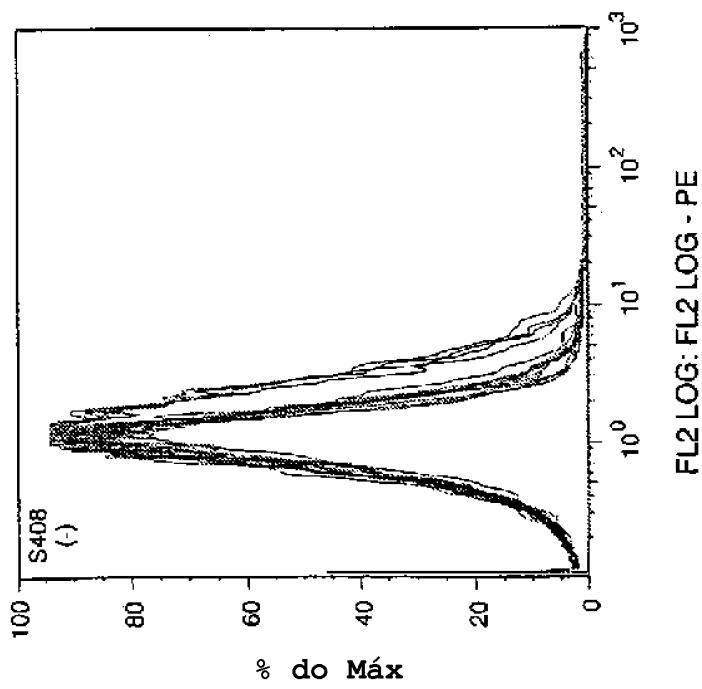
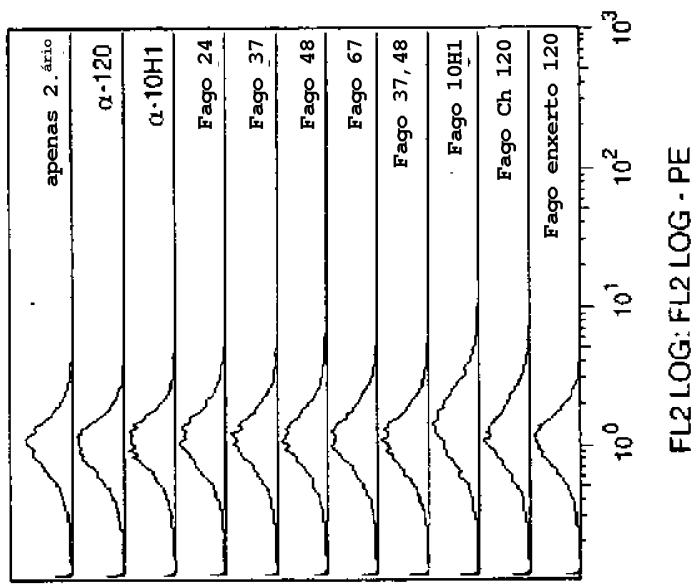


Figura 6A**Figura 6B**

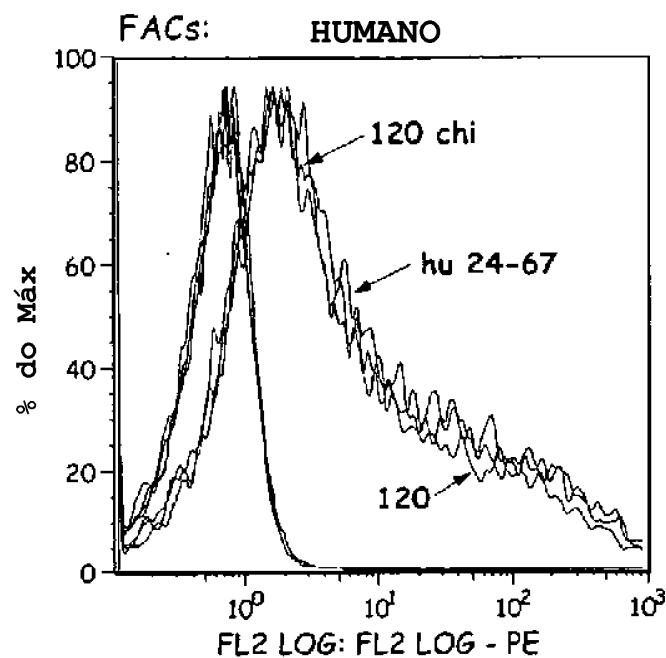


Figura 7A

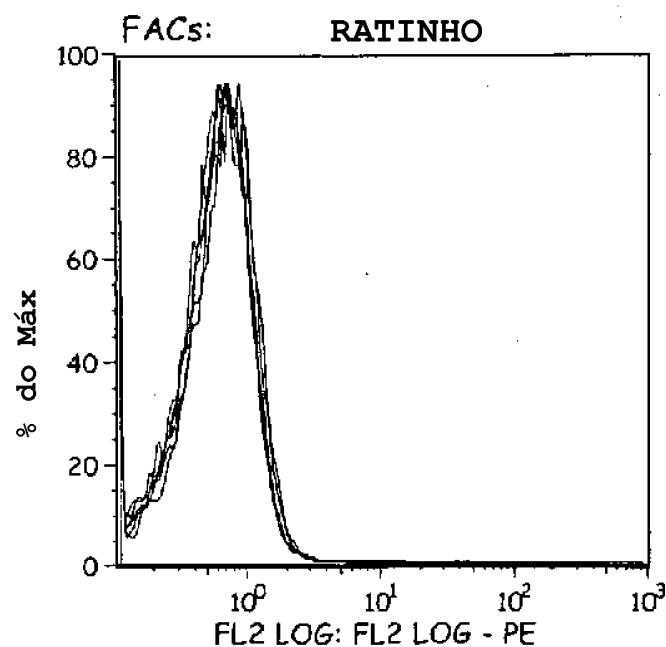


Figura 7B

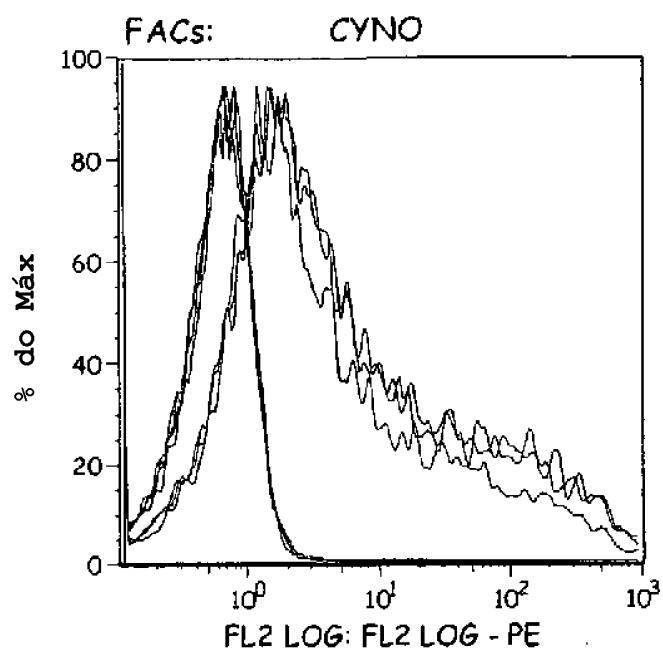


Figura 7C

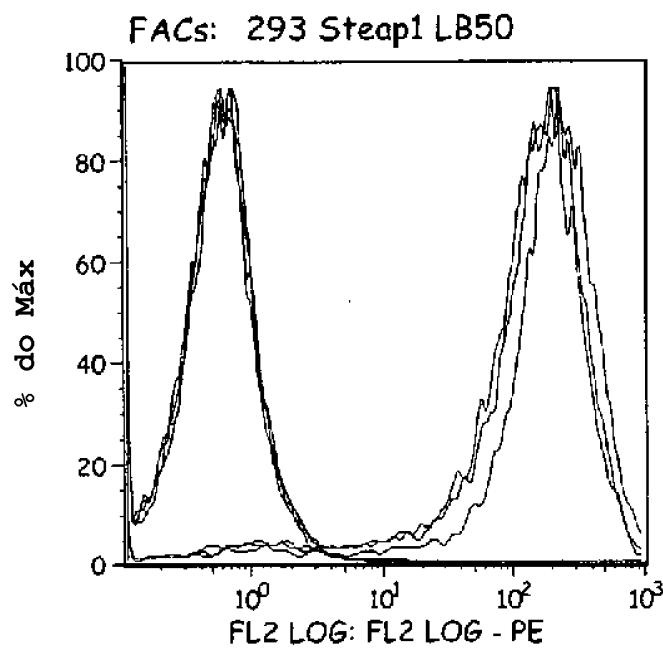


Figura 7D

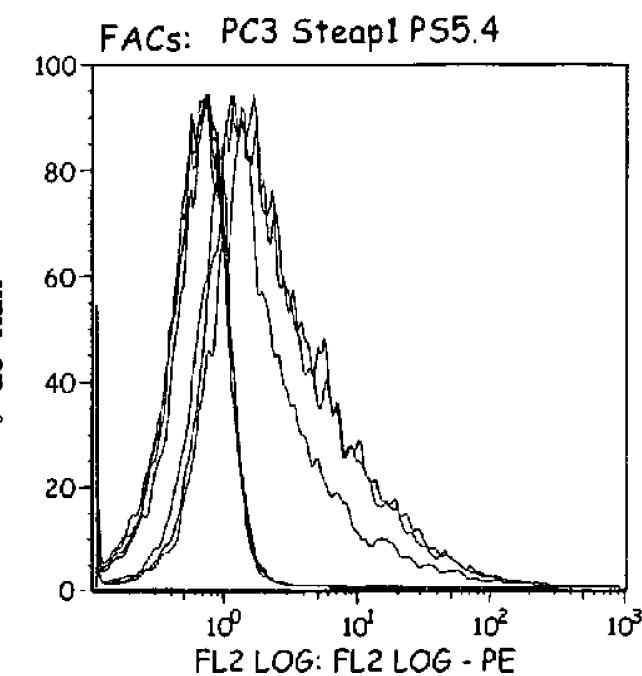


Figura 7E

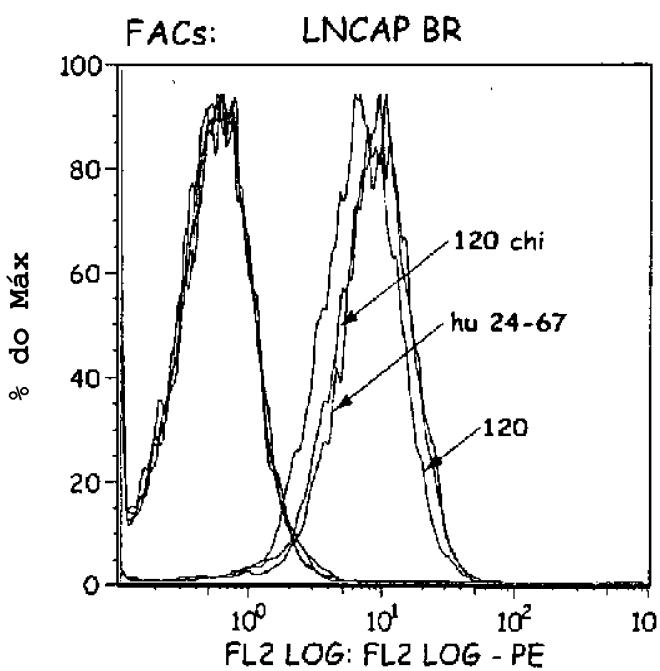


Figura 7F

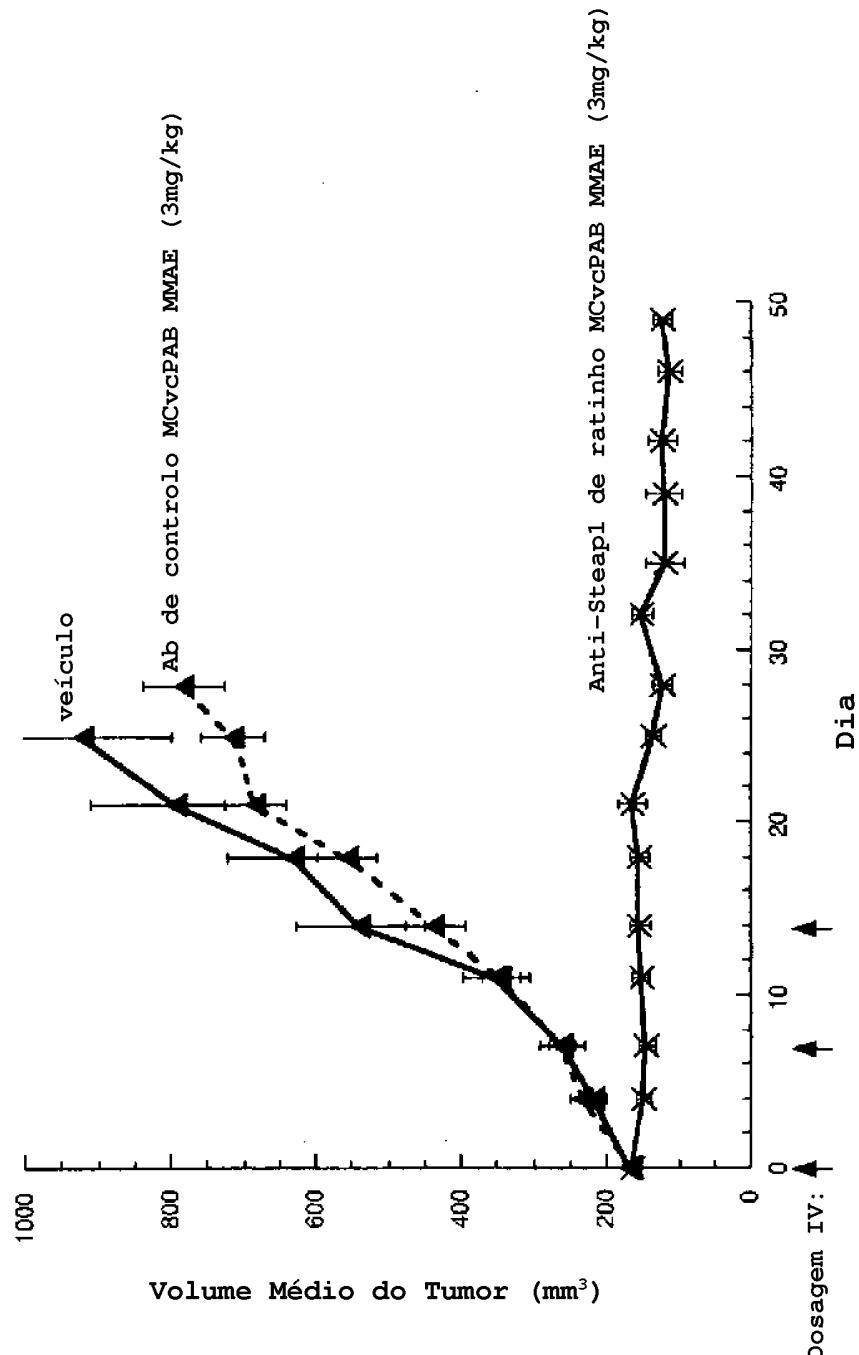
Figura 8A

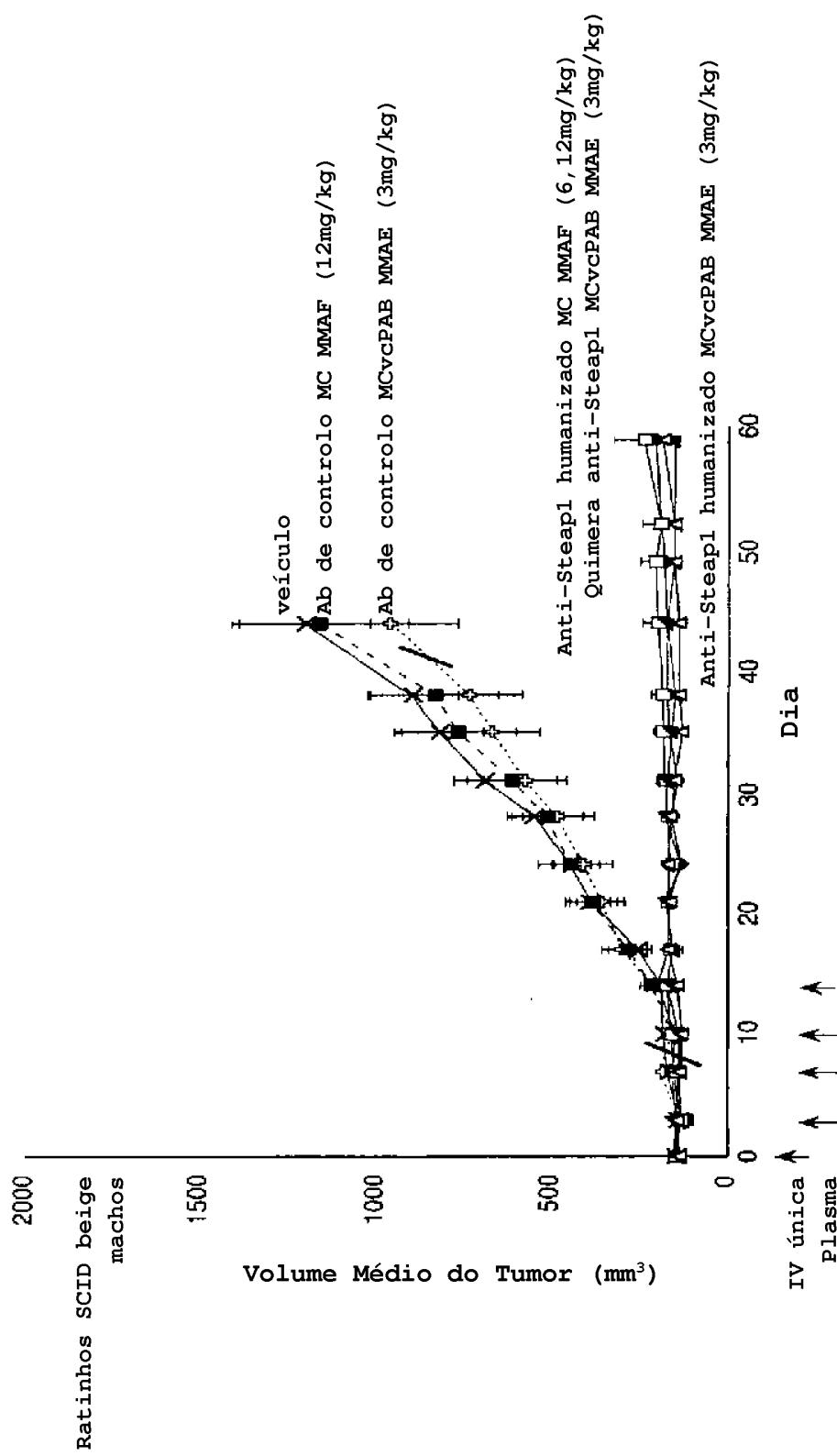
Figura 8B

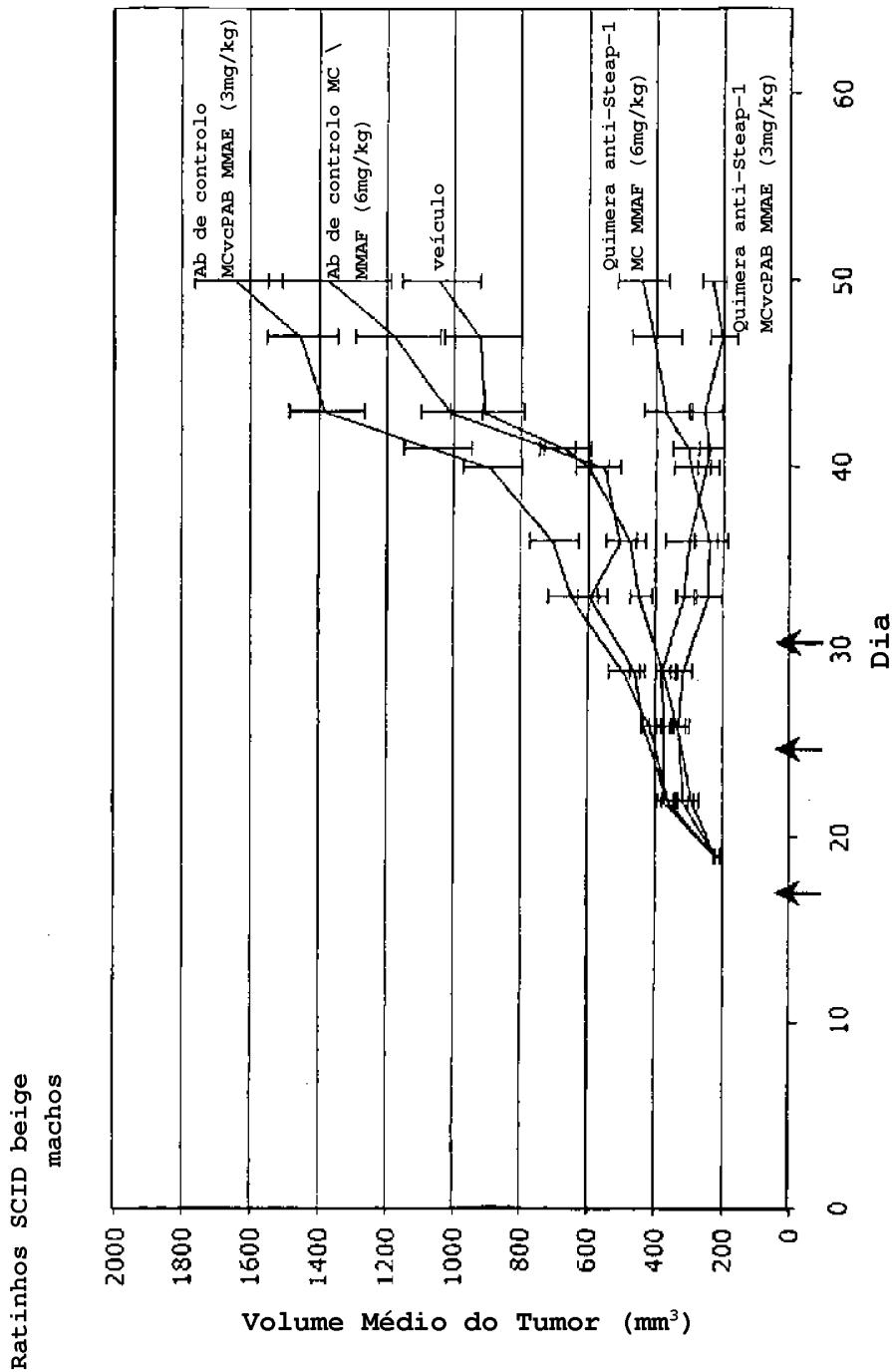
Figura 9

Figura 10

Ratinhos SCID beige
machos

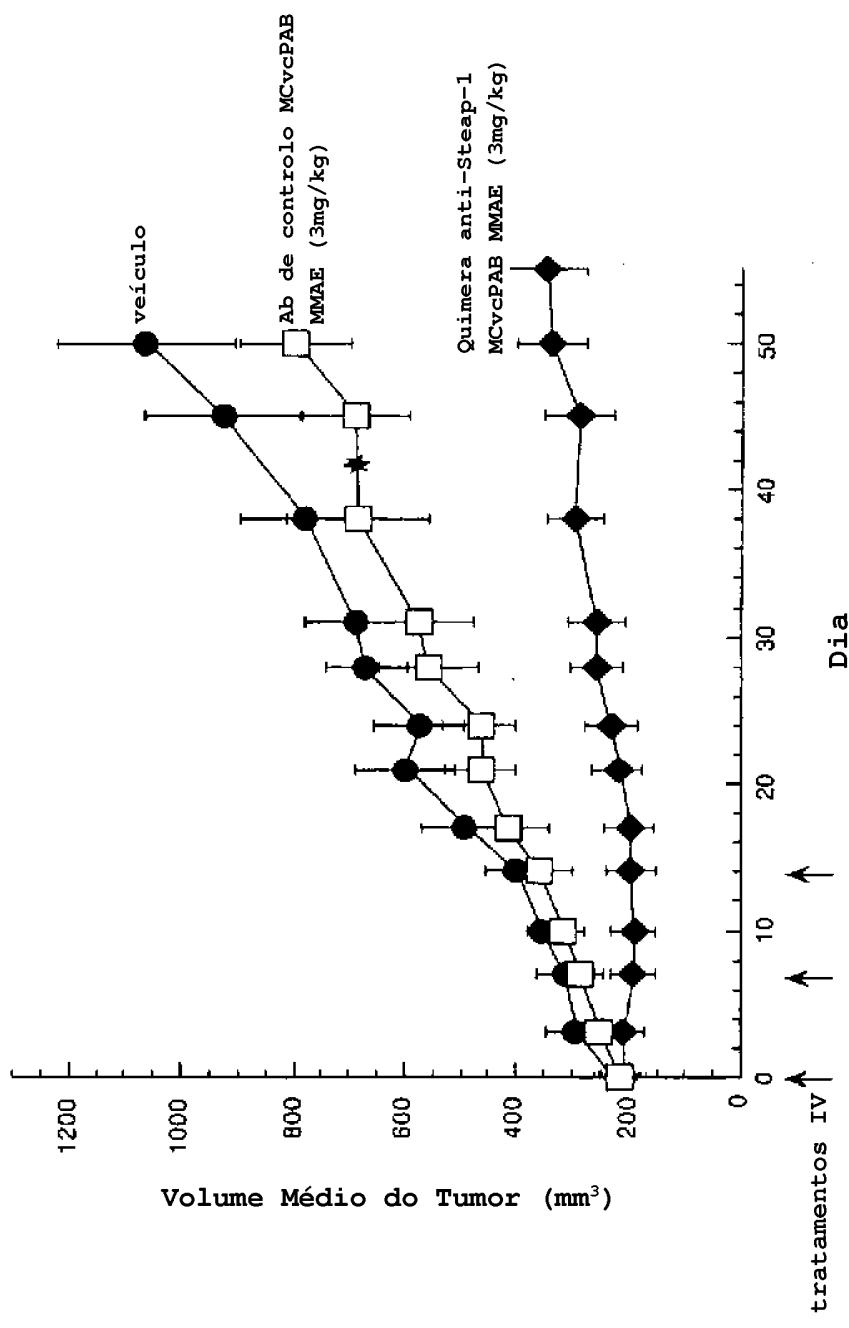


Figura 11

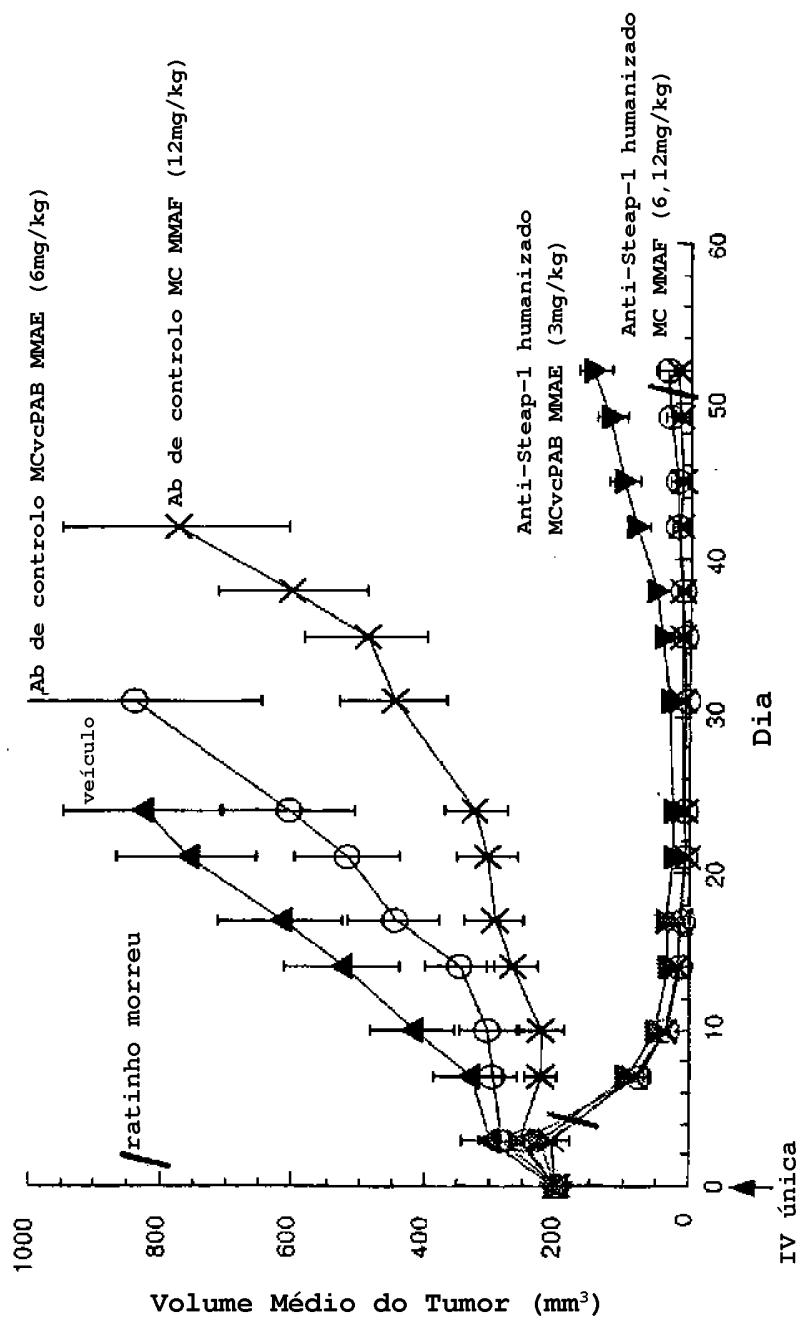


Diagrama Esquemático de STEAP-1 na Membrana Celular

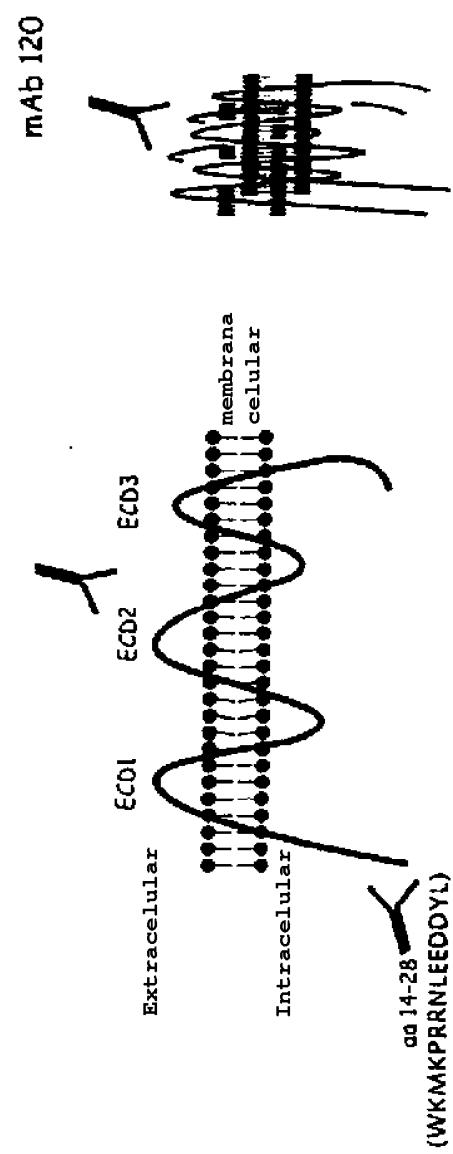


Figura 12

Expressão de STEAP-1 em modelos de cancro da próstata

Modelos exógenos

293 STEAP1 LB50



Figura 13A

Modelos endógenos

PC3 STEAP1 PS55.4



Figura 13B



Figura 13C

Figura 13D

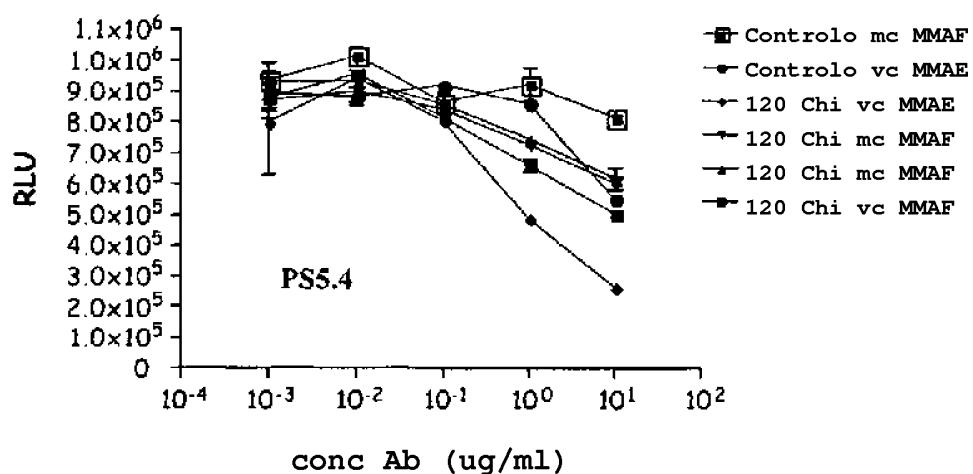
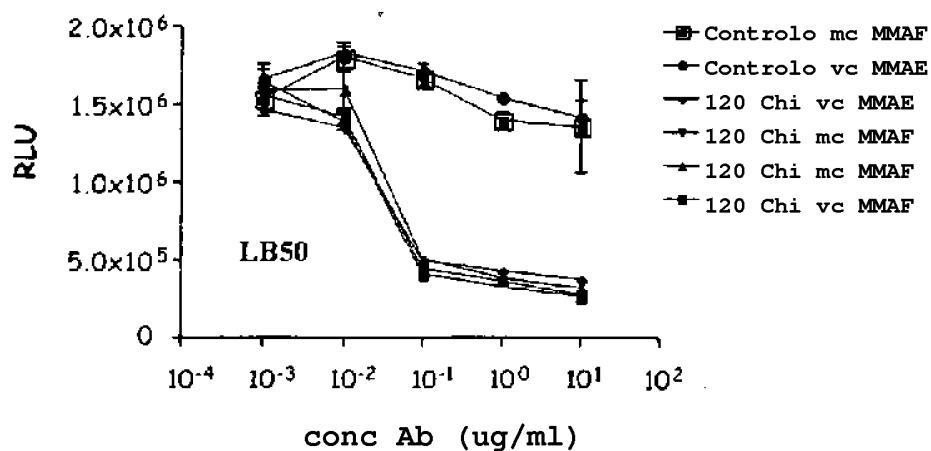
Figura 14A**Figura 14B**

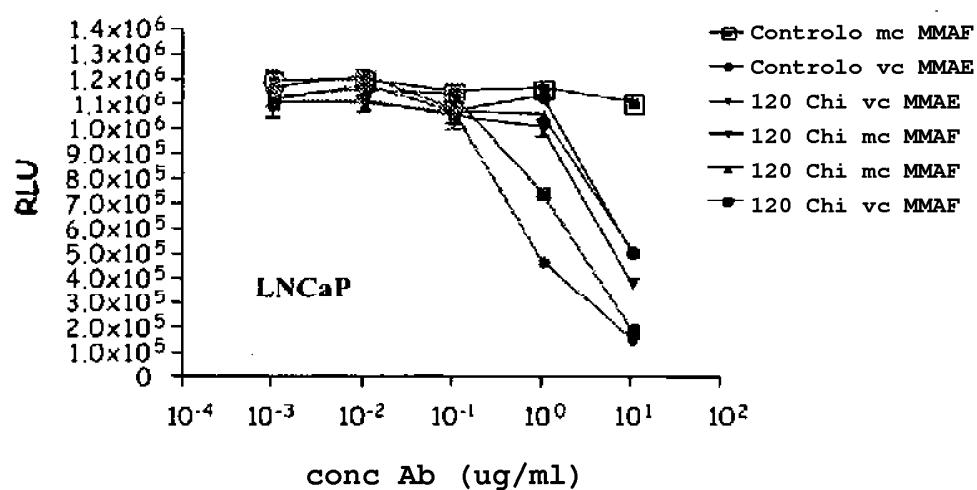
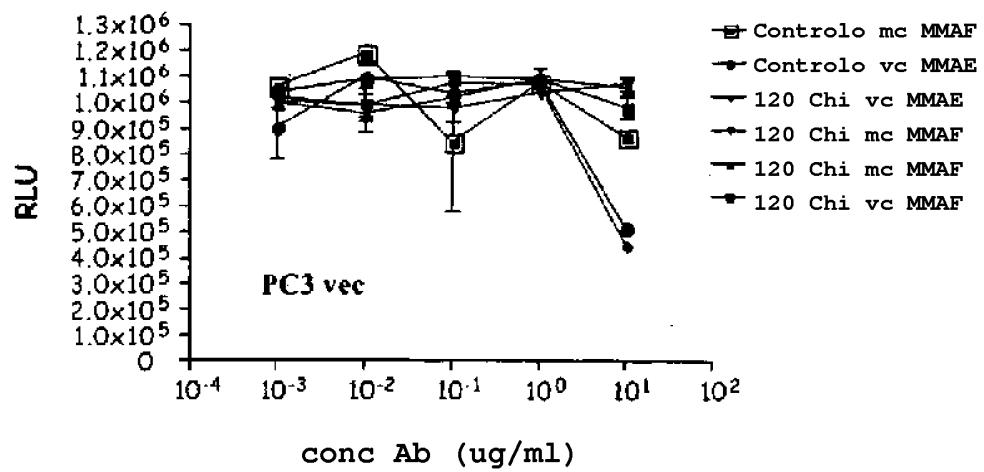
Figura 14C**Figura 14D**

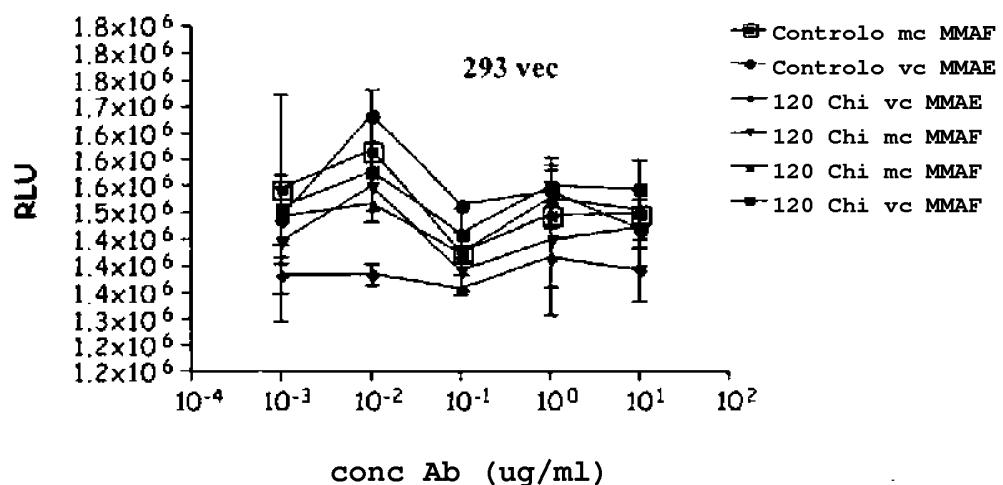
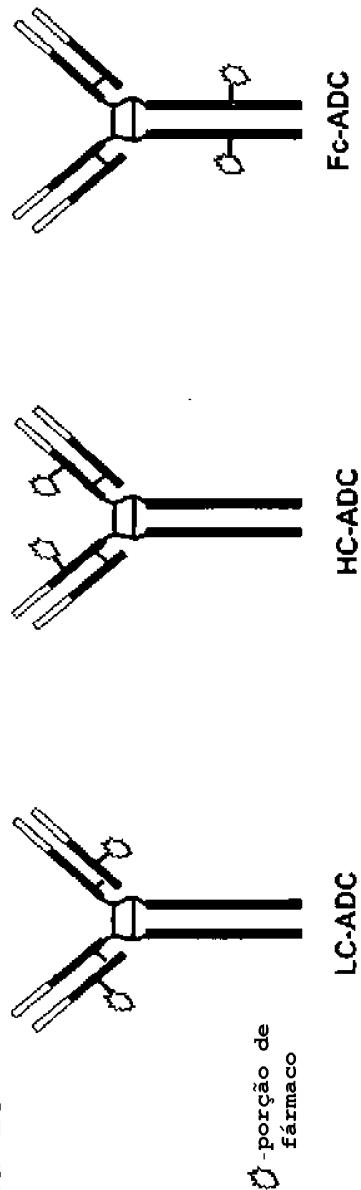
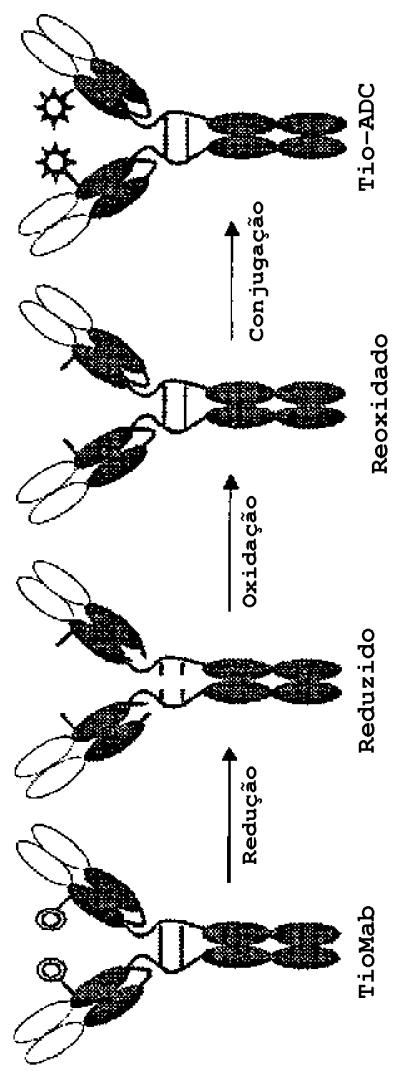
Figura 14E

Figura 15**Figura 16**

Variante Tio-LC (V205C) com a numeração sequencial correspondente

Numeração normalizada >> LC-V205C (numeração de Kabat)

Posição relativa	LC-V210C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	219
LC-V204C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	213	
LC-V211C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	220	
LC-V205C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	214	
LC-V205C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	214	
LC-V205C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	214	
LC-V210C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	219	
LC-V209C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	218	
LC-V209C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	218	
LC-V205C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	214	
STEAP120-LC-V211C	E V T H Q G L S S P	V T K S F N R G E C	220	

Figura 17A

Variante Tio-HC (A121C) com a numeração sequencial correspondente

Numeração normalizada >> HC-A118C (numeração EU)

Posição relativa	HC-A114C	- - - - -	L YL	W GQ GT	L V T V	S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	138
	HC-A123C	- - - N S Y W Y F D V W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	147
	HC-A121C	- - - I P R H A N V F W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	145
	HC-A117C	- - - W T S G L D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	141
	HC-A121C	- - O G F Y A M D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	145
	HC-A121C	- - I S I A G M D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	145
	HC-A121C	- - S W D W Y F D V W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	145
	HC-A124C	- R S H V G Y F D V W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	148
	HC-A118C	- - - I R L D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	142
	HC-A121C	- - R G D Y S M D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	145
	STEAP120-HC- A125C	Y D D Y Y Y A M D Y W G Q C T	L V T V S S A S T K	G P S V F P L A P S S K	S T S G G T A A L	A A L	A A L	A A L	149

Figura 17B

Variante Tio-**Fc** (S400C) com a numeração sequencial correspondente

Numeração normalizada > **Fc-S400C** (numeração EU)

Posição relativa	HC-S396C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 438
	HC-S405C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 447
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S399C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 441
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 448
	HC-S400C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 442
	HC-S403C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 445
	HC-S407C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S 449
	STEAP120-HC-S407C	V L D S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S

Figura 17C

Figura 18A

293 Steap1 c.LB50

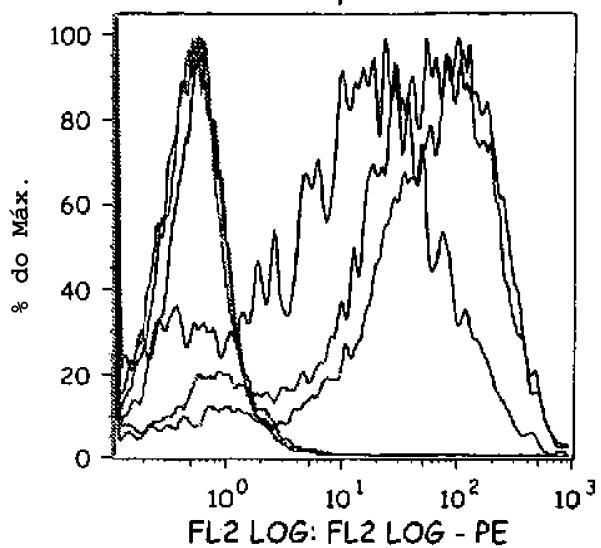
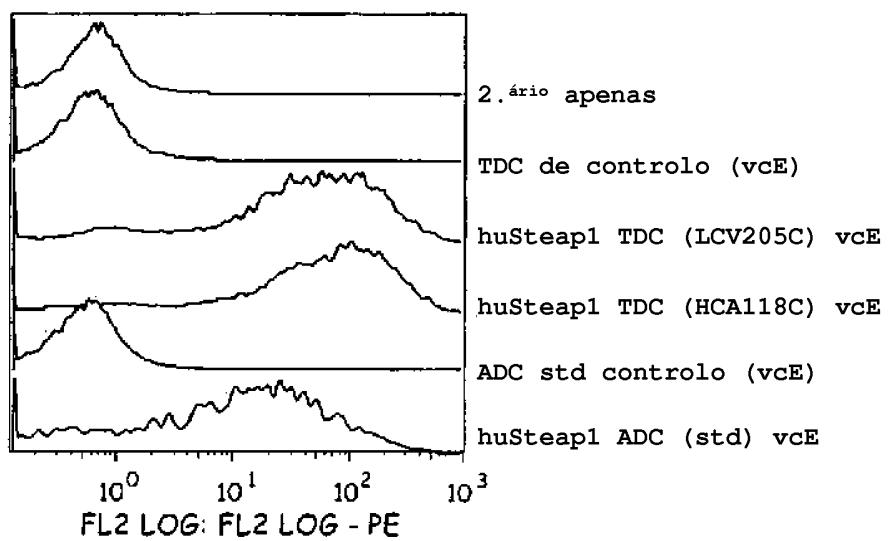
**Figura 18D**

Figura 18B
PC3 Steap1 c.PS5.4

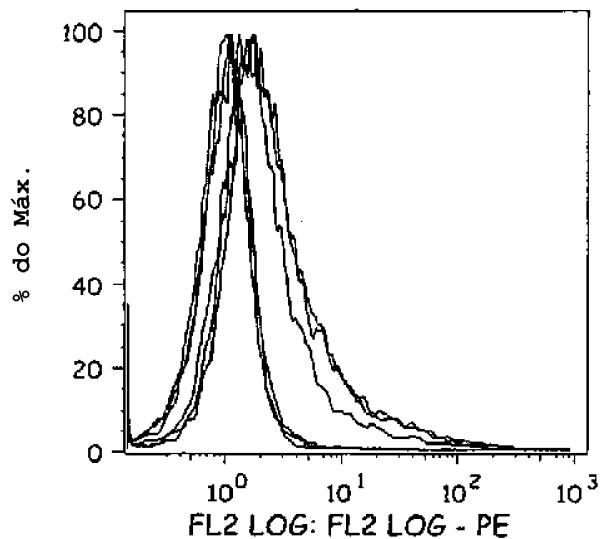


Figura 18E

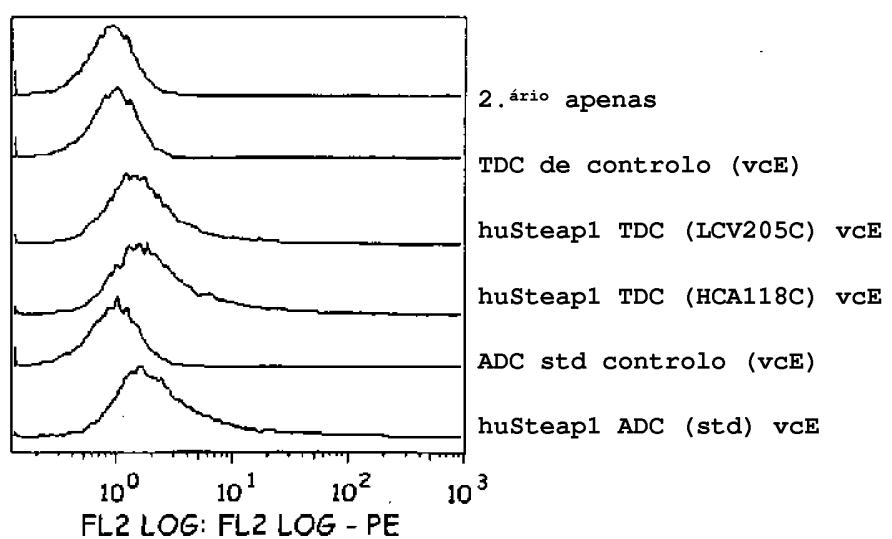


Figura 18C

LNCaP

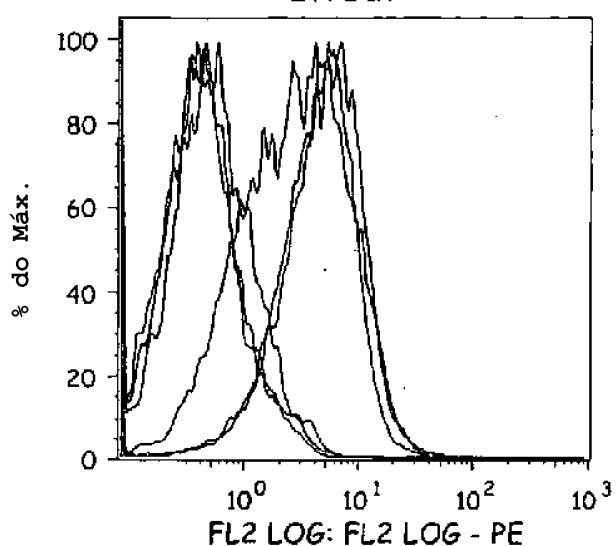
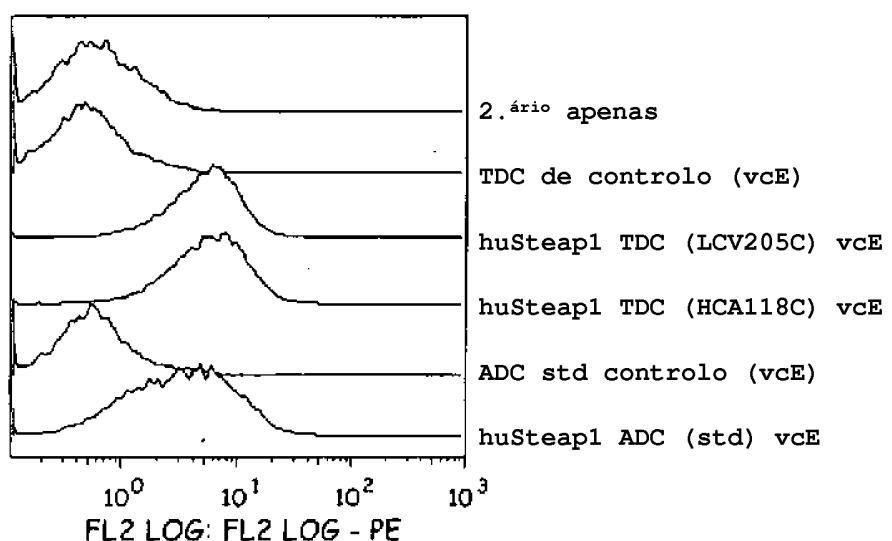
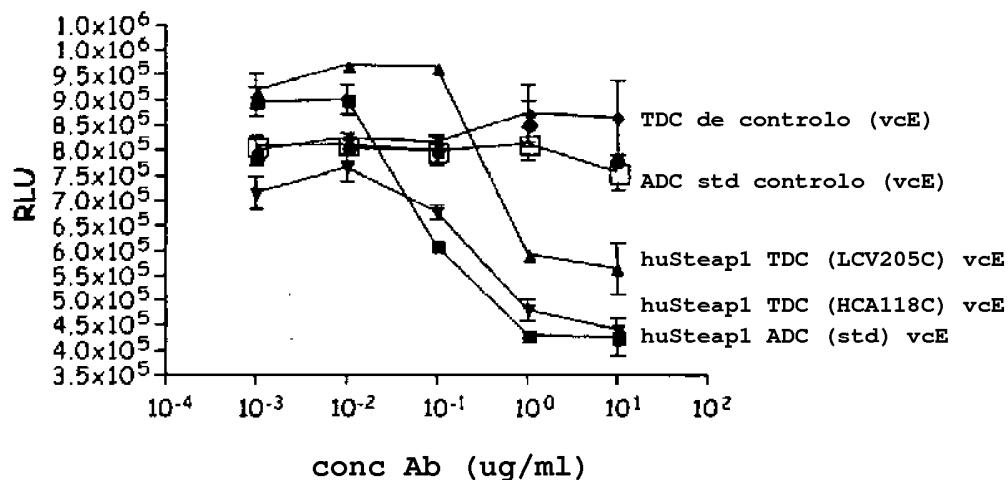
**Figura 18F**

Figura 19A

LB50 2K/poço

**Figura 19B**

PS 5.4 2K/poço

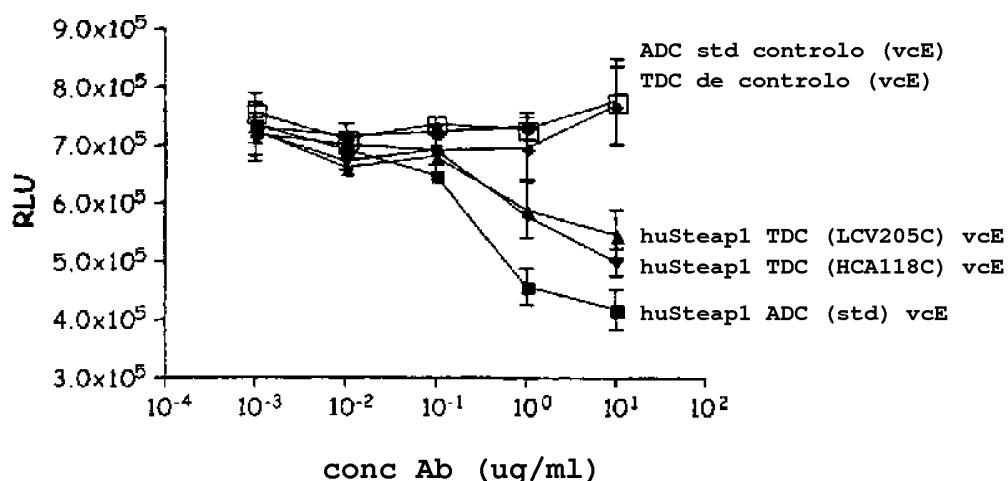
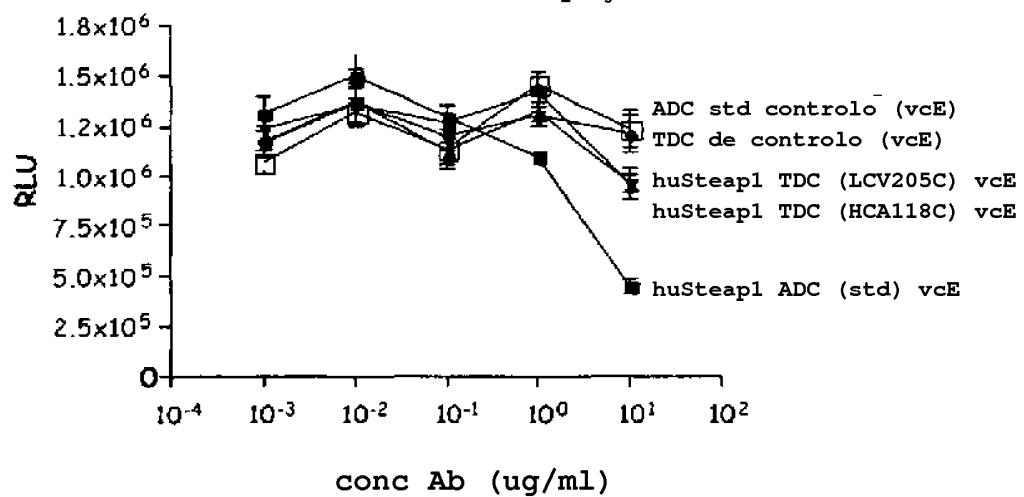


Figura 19C**LNCAP 3K/poço**

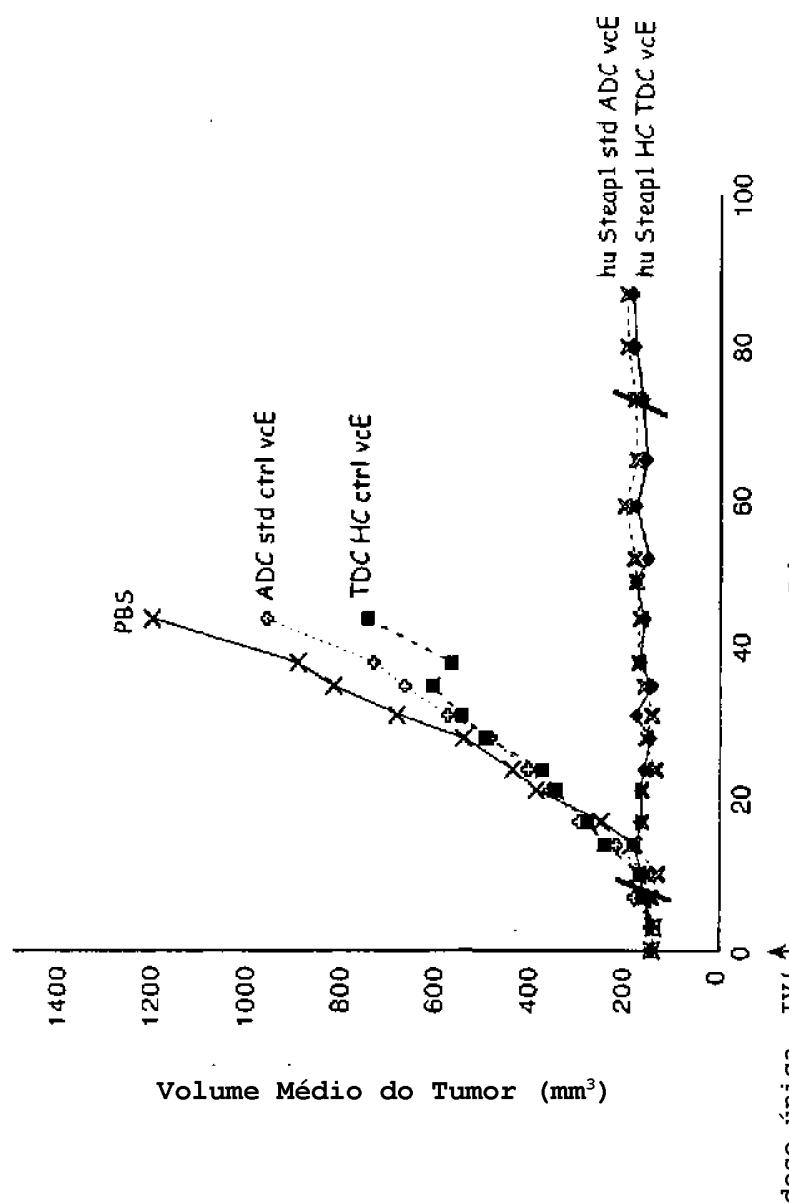


Figura 20

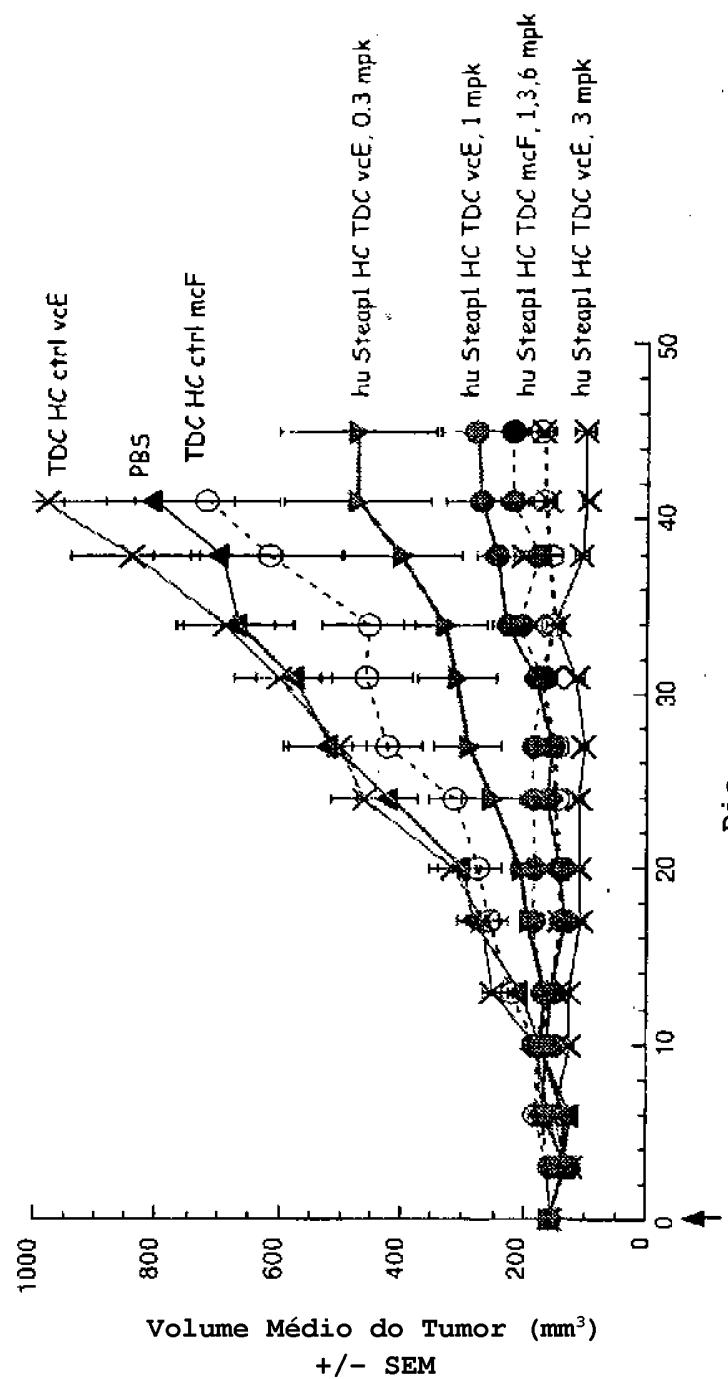


Figura 21

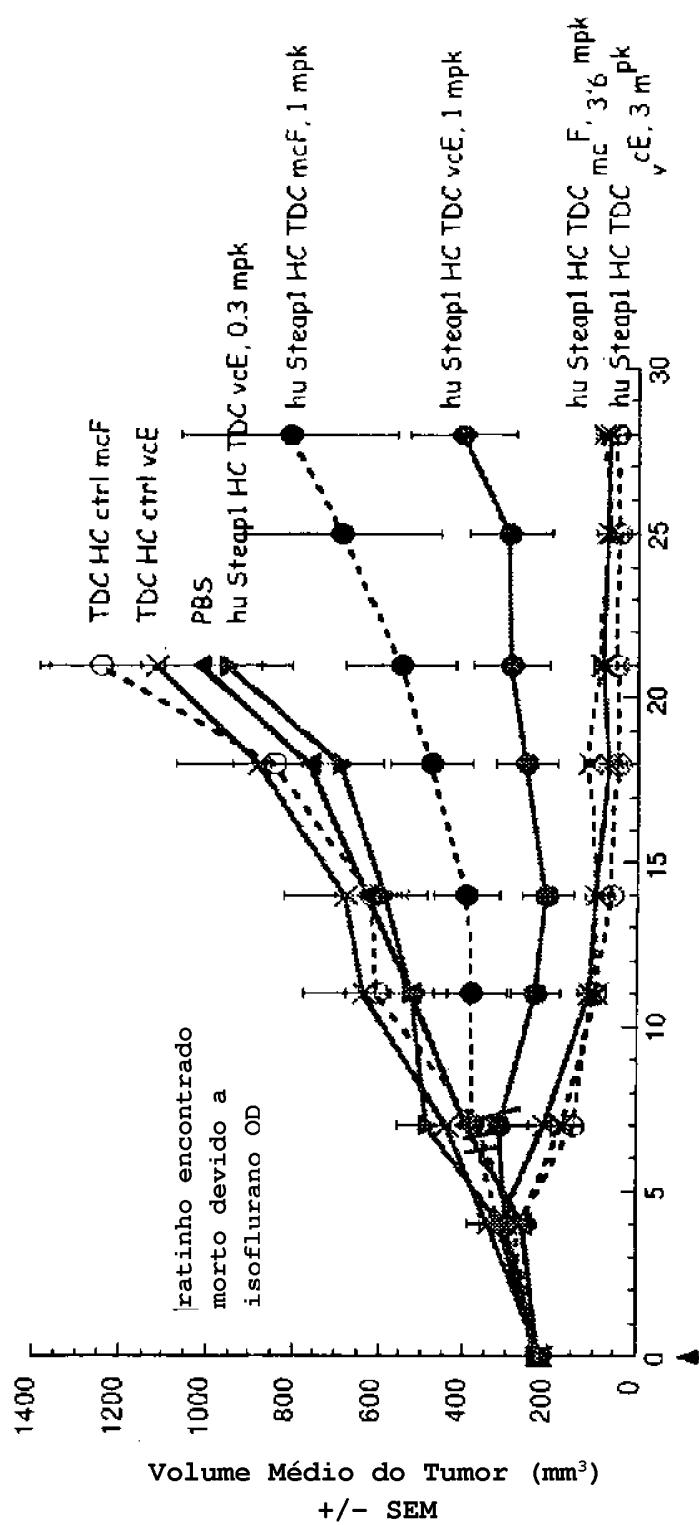


Figura 22

Diferenças em VL de 120 - Capa I vs IV

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F	28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
		Kabat - CDR L1
		Chothia - CDR L1
		Contacto - CDR L1
120	D I V M S Q S P S S L A V S V G E K V T M S C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q	
Simmons IV	D I V M T Q S S P D S S L A V S L Q B R A T I N C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q	
120.v24	D I Q N T Q S S P S S A S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q	
*	*	*
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	
		Kabat - CDR L2
		Chothia - CDR L2
		Contacto - CDR L2
120	Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S S G T D F T L T I S S V K A	
Simmons IV	Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G T D F T L T I S S L Q A	
120.v24	Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P	
*	*	*
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	
		Kabat - CDR L3
		Chothia - CDR L3
		Contacto - CDR L3
120	E D L A V Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G G G T K V B I K R	
Simmons IV	E D V A V Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G Q G T K V E I K R	
120.v24	E D F A T Y Y C Q Q Y Y N Y P R T P G Q G T K V E I K R	
*	*	*

Figura 23 (PARTE 1)

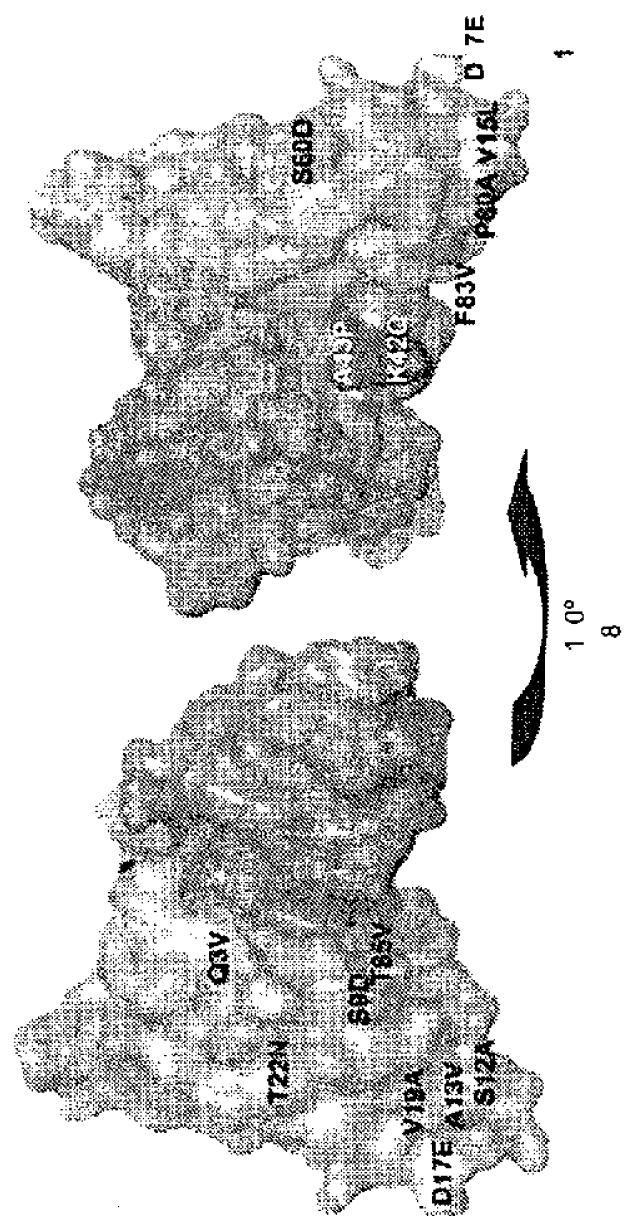


Figura 23 (PARTE 2)

Localização de Alterações xSteap1 LC FW

Kahat	2	2	2	2	2	2	2
Alterações para melhorar afinidade							
Sinônimos IV DIVINTQS PDSLAVS GERATING INSSQELLYRS DEDENYI VYOKPCKAPKULVMASTRE	2	2	2	2	2	2	2
LS.VLWH2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
LSO	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
LSCH1	V	V	V	V	V	V	V

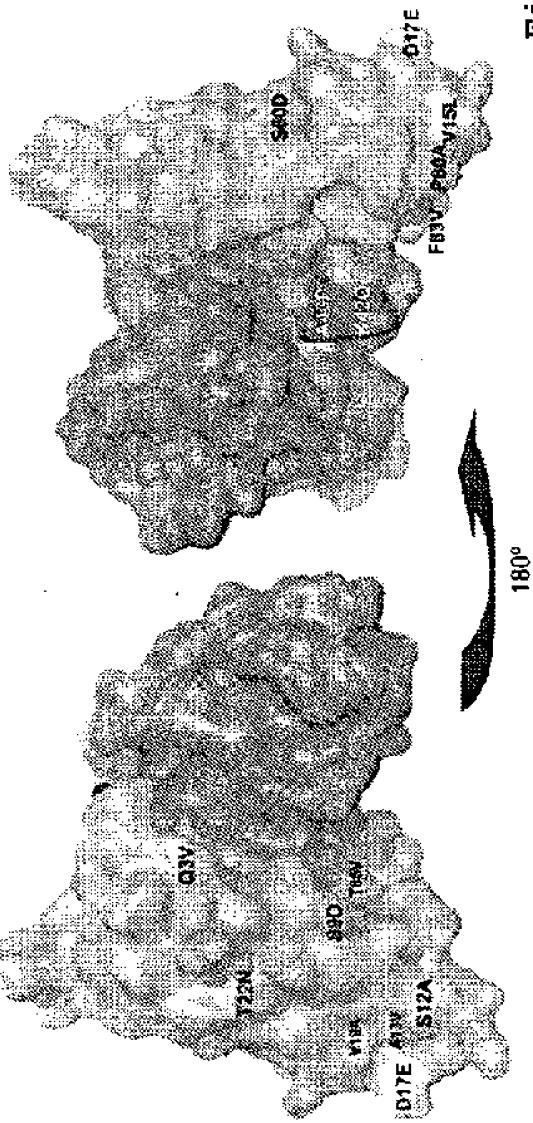


Figura 24

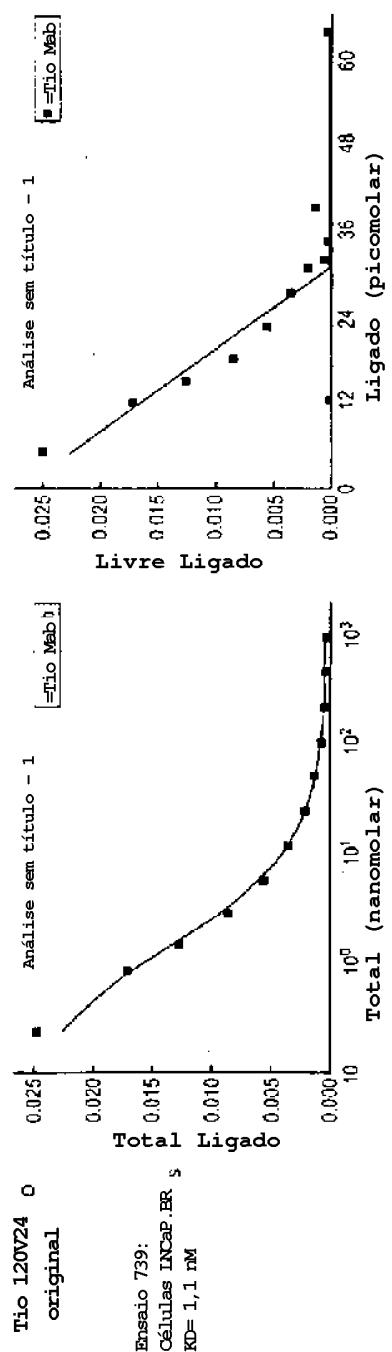
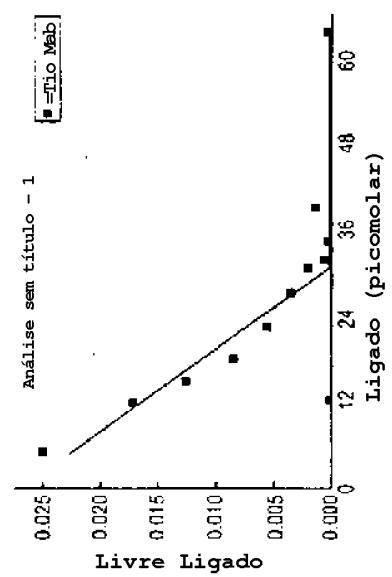
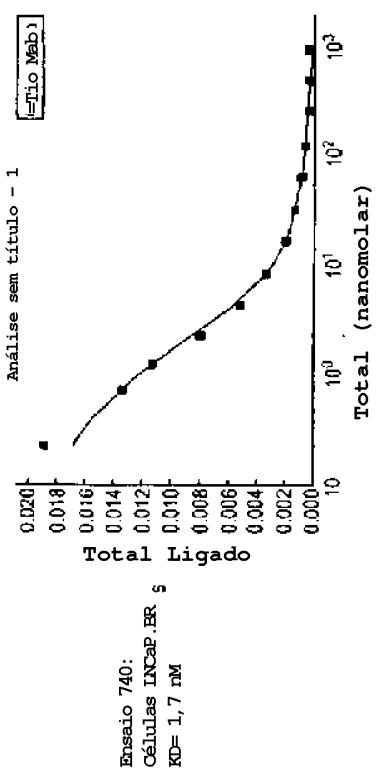
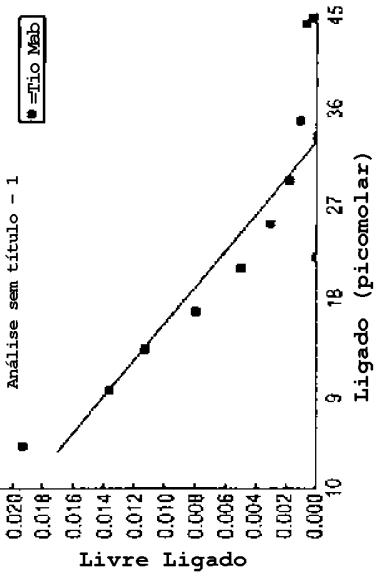
Figura 25A**Figura 25B****Figura 25C****Figura 25D**

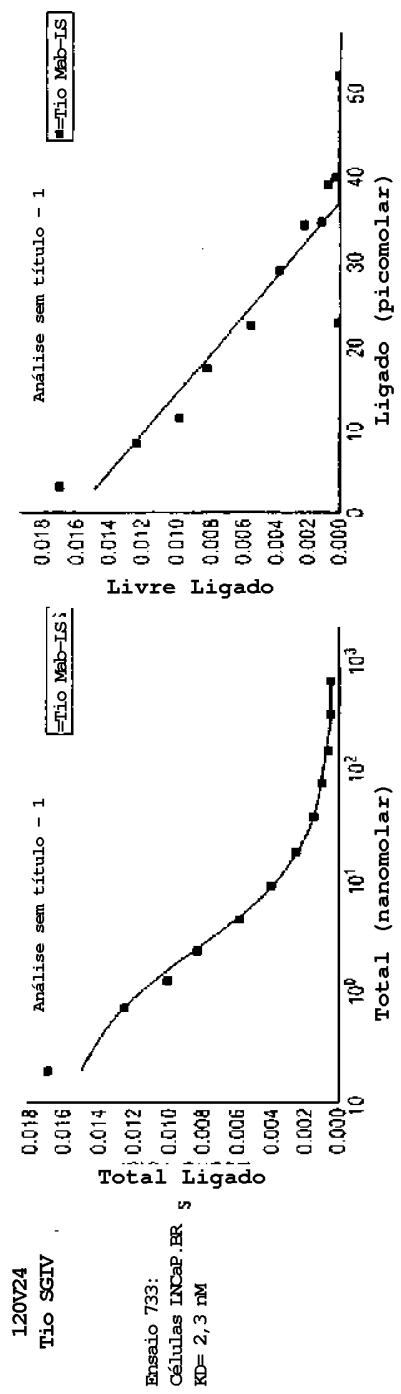
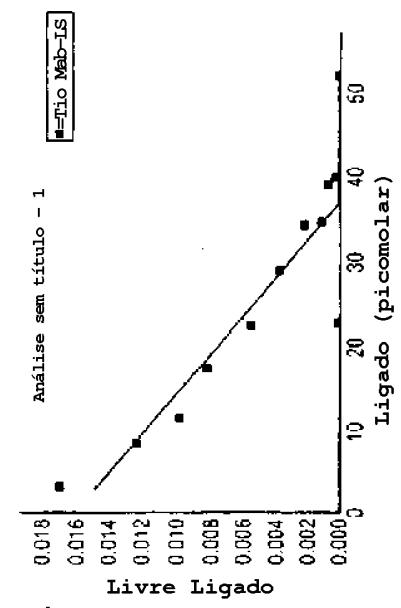
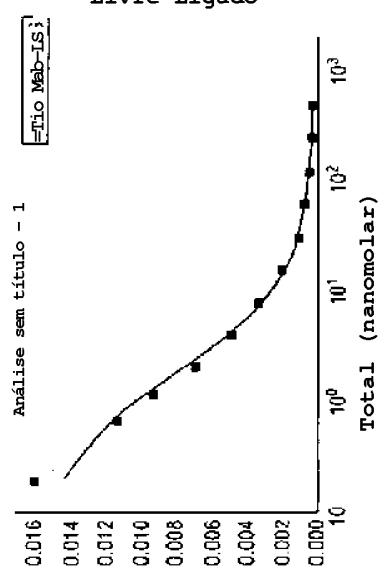
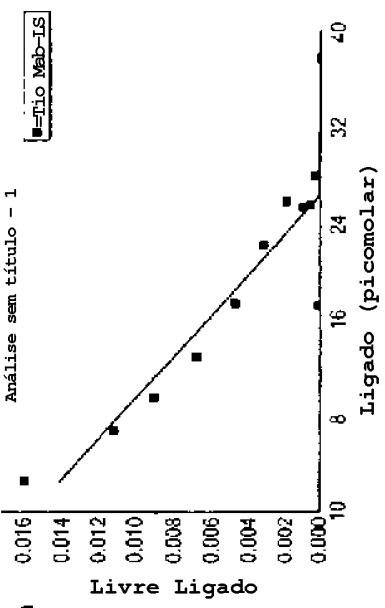
Figura 25E**Figura 25F****Figura 25G****Figura 25H**

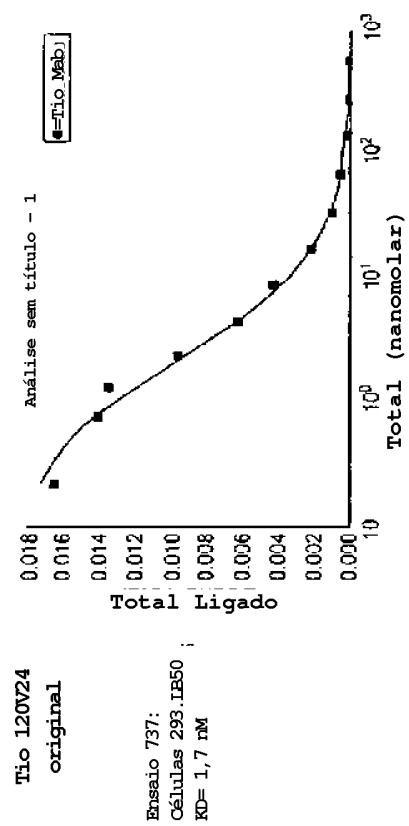
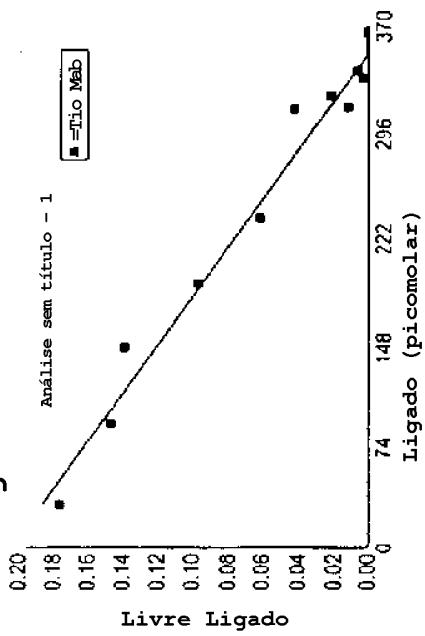
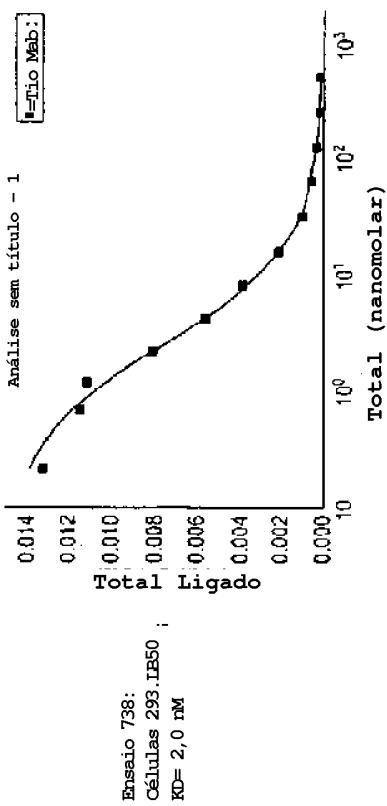
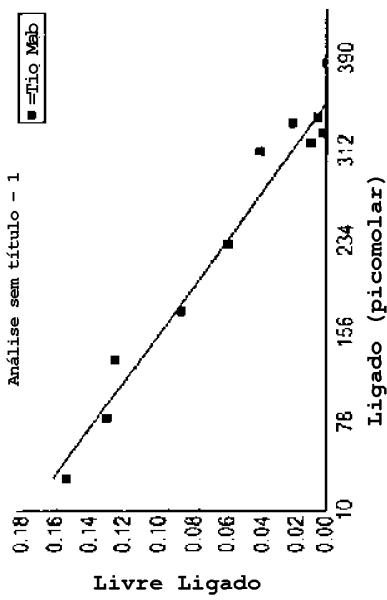
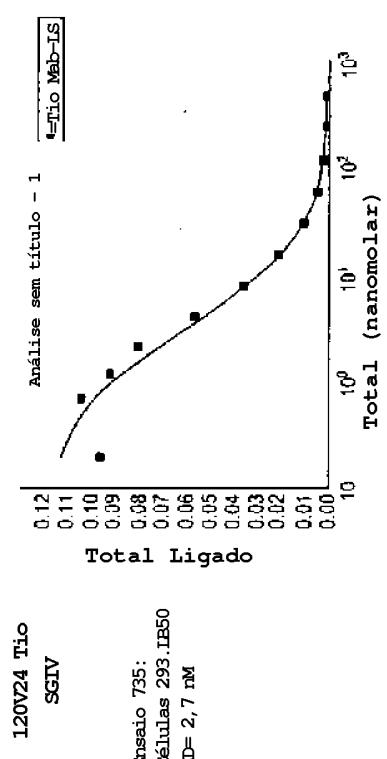
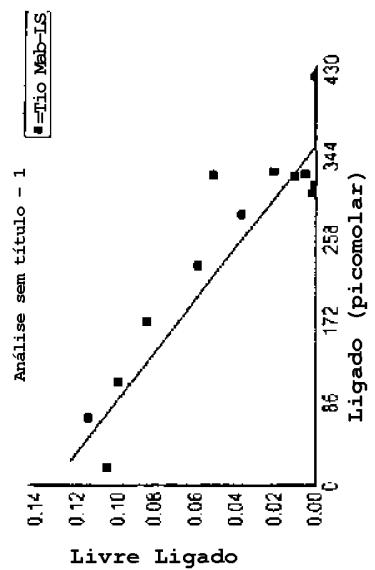
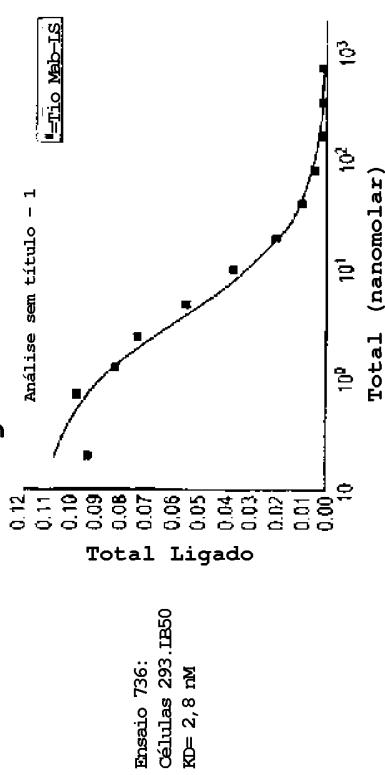
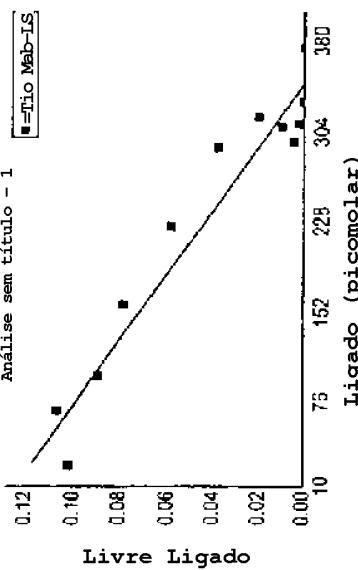
Figura 26A**Figura 26B****Figura 26C****Figura 26D**

Figura 26E**Figura 26F****Figura 26G****Figura 26H**

Dados de Scatchard de anticorpos humanizados contra Steap1

Análise Scatchard

	murino <u>$\alpha 179$</u>	Fc quim. <u>$\alpha 120$</u>	Fc quim. <u>PUR 10162)</u>	120v24 humano <u>PUR 11712)</u>	tio orig. <u>PUR 12813)</u>	tio SGIV <u>PUR 14951)</u>
PC3-PSS5.4	~23.4 nM ~5,920	17.5 nM 187,256	9.9 nM 103,204			1.5X
293-LB50	4.7 nM 25,368	4.7 nM 301,100	4.9 nM 252,892	2.2 nM 264,172	1.9 nM	2.8 nM
LNCaP-BR	3.3 nM 2,626	1.5 nM 37,207	0.9 nM 22,021		1.4 nM	2.1 nM

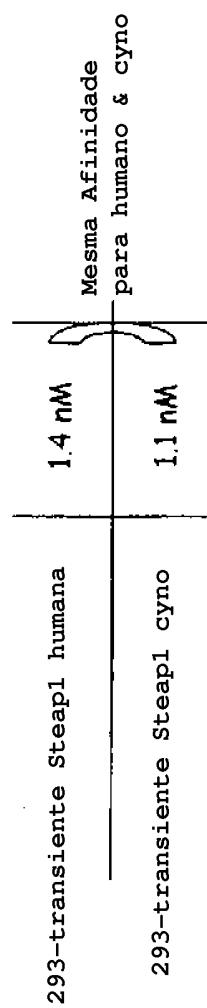


Figura 27

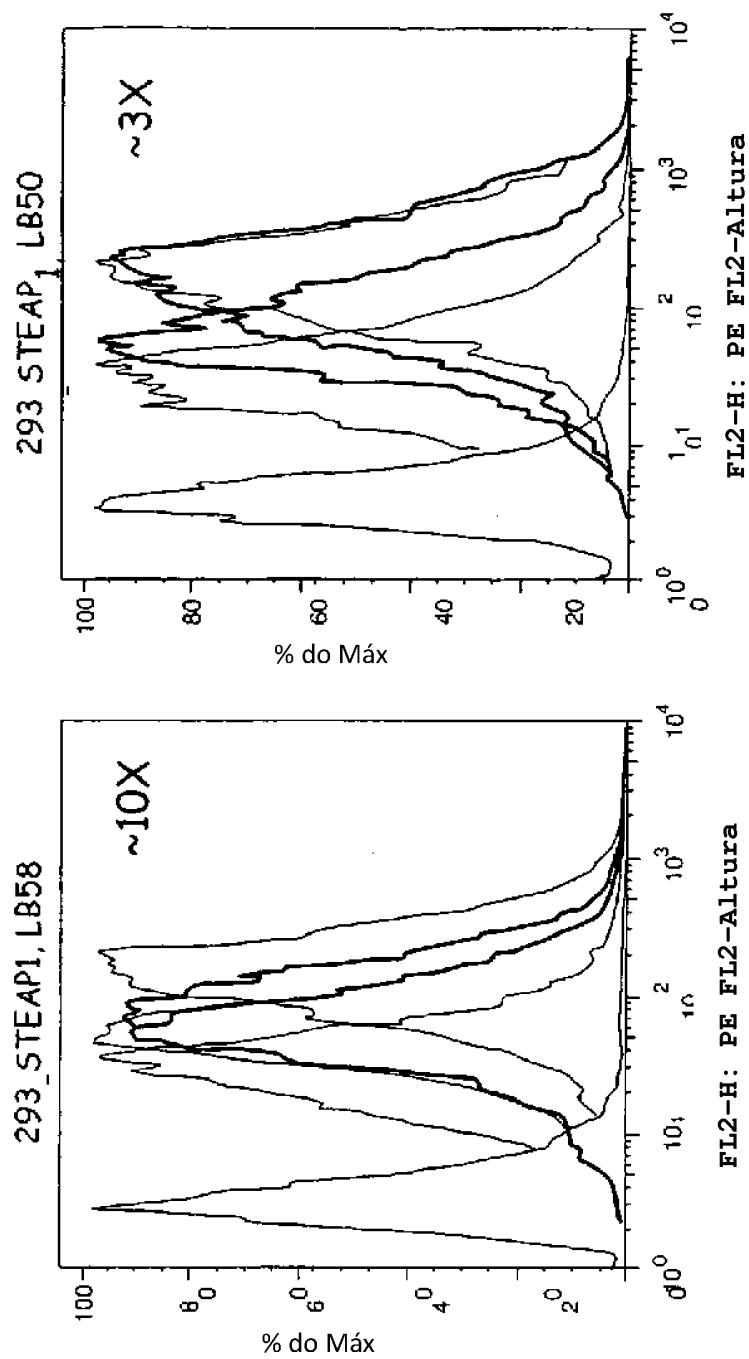
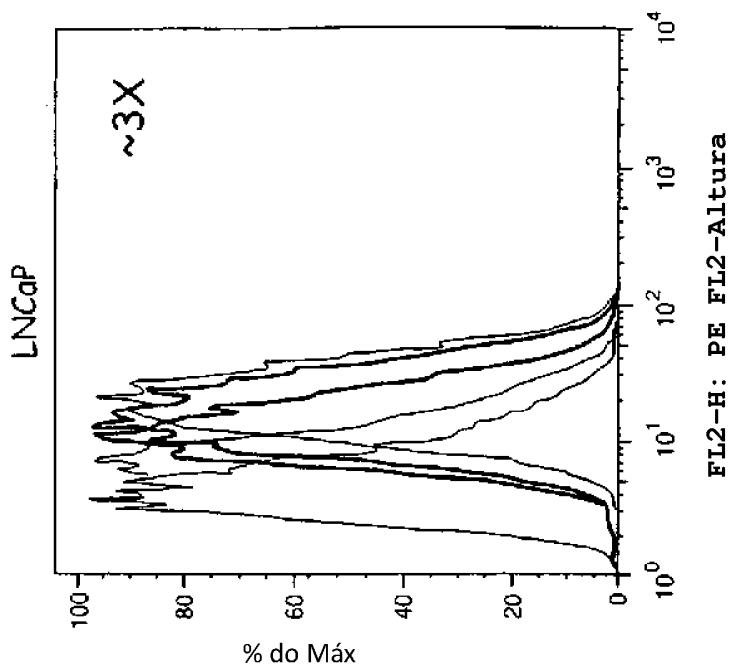
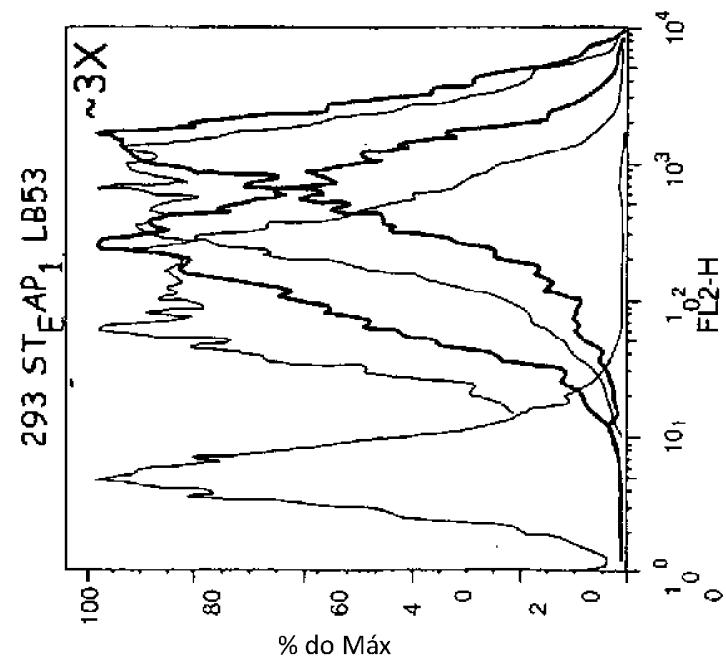
Figura 28A**Figura 28B**

Figura 28D**Figura 28C**

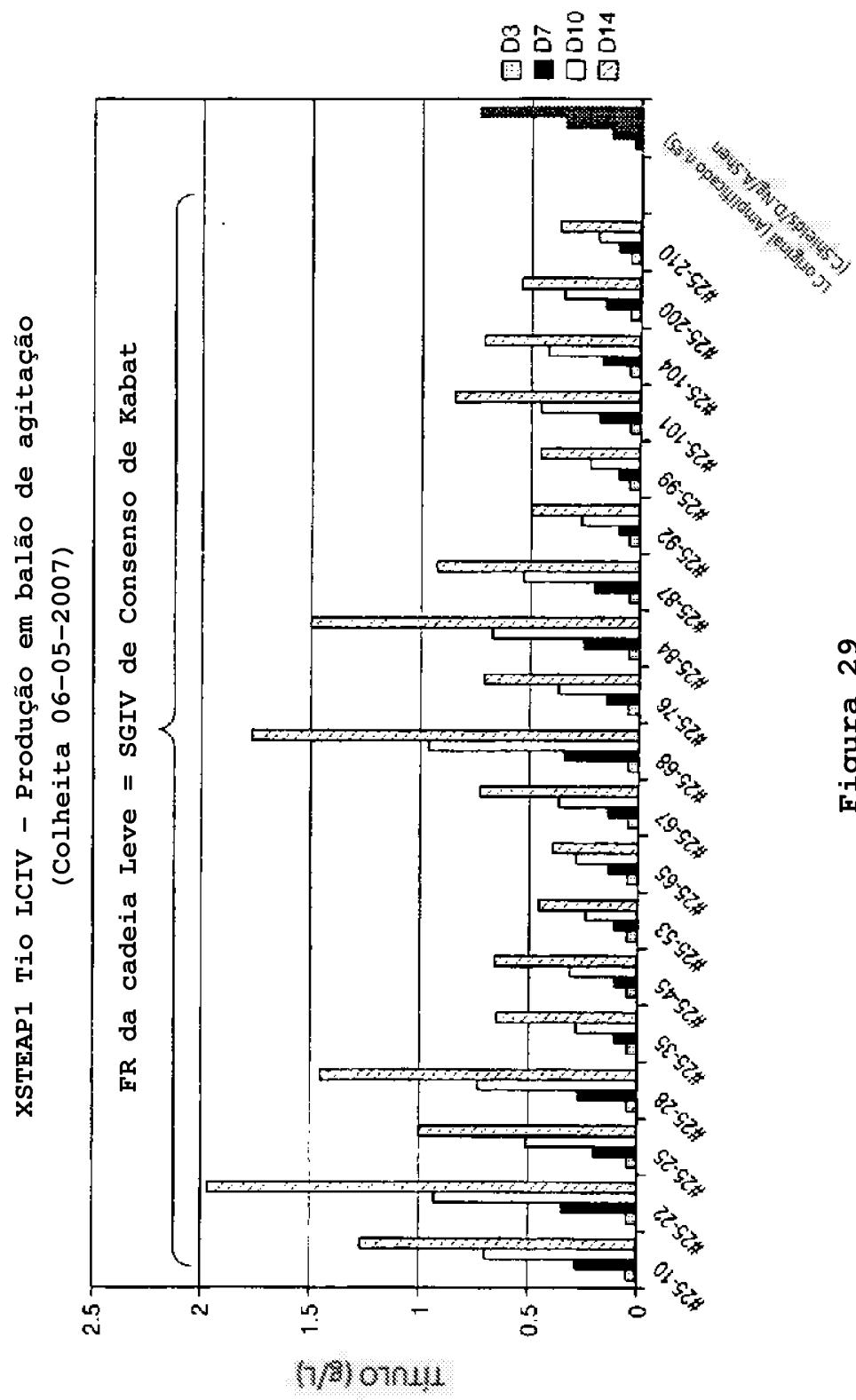


Figura 29