



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

(11) BR 112015013444-0 B1



(22) Data do Depósito: 23/07/2013

(45) Data de Concessão: 01/11/2022

(54) Título: USO DE UM IMUNOCONJUGADO

(51) Int.Cl.: A61K 51/00; A61M 36/14.

(30) Prioridade Unionista: 07/01/2013 US 61/749,548; 13/12/2012 US 61/736,684.

(73) Titular(es): IMMUNOMEDICS, INC..

(72) Inventor(es): SERENGULAM V. GOVINDAN; DAVID M. GOLDENBERG.

(86) Pedido PCT: PCT US2013051667 de 23/07/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/092804 de 19/06/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/06/2015

(57) Resumo: DOSAGENS DE IMUNOCONJUGADOS DE ANTICORPOS E SN-28 PARA EFICÁCIA MELHORADA E TOXICIDADE REDUZIDA. A presente invenção refere-se a imunoconjugados terapêuticos que compreendem SN-38 anexados a um anticorpo ou fragmento de anticorpo ligador de antígeno. O anticorpo pode ligar-se a EGP-1 (TROP-2), CEACAMS, CEACAM6, CD74, CD19, CD20, CD22, CSAp, HLA-DR, AFP ou MUC5ac e o imunoconjugado pode ser administrado a uma dosagem de entre 4 mg/kg e 24 mg/kg, preferivelmente 4, 6, 8, 9, 10, 12, 16 ou 18 mg/kg. Quando administrado em dosagens específicas segundo certos programas, o imunoconjugado pode reduzir o tamanho de tumores sólidos, reduzir ou eliminar metástases e é eficaz no tratamento de cânceres resistentes a terapias-padrão, como radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia.

USO DE UM IMUNOCONJUGADO

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício de acordo com a 35 U.S.C. 119(e) dos Pedidos de Patente Provisórios U.S. 61/736.684, depositado em 13/12/12; e 61/749.548, depositado em 07/01/13.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequência que foi apresentada em formato ASCII via EFS-Web e é incorporada em sua totalidade neste documento para referência. A referida cópia ASCII criada em 17 de julho de 2013 é nomeada IMM340WO1_SL.txt e tem o tamanho de 60.405 bytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção diz respeito ao uso terapêutico de imunoconjutados de anticorpos ou fragmentos de anticorpos de ligação ao antígeno e camptotecinas, tais como SN-38, com capacidade melhorada para combater várias células cancerígenas em sujeitos humanos. Em modalidades preferenciais, os anticorpos e fragmentos terapêuticos são ligados através de uma ligação clivável intracelularmente que aumenta a eficácia terapêutica. Em mais modalidades preferenciais, os imunoconjutados são administrados em dosagens específicas e/ou programas específicos de administração que otimizam o efeito terapêutico. As dosagens otimizadas e programas de administração de anticorpos conjugados de SN-38 para uso terapêutico em humanos divulgadas neste documento mostram eficácia superior inesperada que não poderia ter sido previda a partir de estudos com modelos animais, permitindo o tratamento eficaz de cânceres que são resistentes a terapias anti-câncer padronizadas, incluindo o composto o composto parental, irinotecano (CPT-11).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[004] Já por muitos anos cientistas tem como objetivo, dentro do campo de terapia com medicamentos especificamente direcionados, utilizar anticorpos monoclonais (MAbs) para a administração específica de agentes tóxicos para o câncer humano. Os conjugados de MAbs associados a tumores e agentes tóxicos adequados foram desenvolvidos, porém, tem tido sucesso quando misturados na terapia do câncer em humanos, e quase sem aplicação em outras doenças, tais como doenças infecciosas e autoimunes. O agente tóxico é mais comumente um medicamente quimioterápico, apesar de radionuclídeos emissores de partículas ou toxinas bacterianas ou de plantas também terem sido conjugados aos MAbs, especialmente para a terapia do câncer (Sharkey e Goldenberg, *CA Cancer J Clin.* 2006 Jul-Aug;56(4):226-243) e mais recentemente, com radioimunoconjugados para terapia pré-clínica de determinadas doenças infecciosas (Dadachova e Casadevall, *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006;50(3):193-204).

[005] As vantagens do uso de conjugados de medicamentos quimioterápicos ligados a MAb são (a) o próprio medicamento quimioterápico é estruturalmente bem definido; (b) o medicamente quimioterápico é ligado a proteína MAb usando elementos químicos de conjugação muito bem definidos, frequentemente em locais específicos e remotos das regiões de ligação do antígeno das MAbs; (c) os conjugados de medicamentos quimioterápicos ligados a MAb podem ser feito mais reproduzivelmente e habitualmente com menos imunogenicidade do que os conjugados químicos envolvendo MAbs e toxinas bacterianas ou de plantas, sendo os primeiros mais passíveis ao desenvolvimento comercial e aprovação regulatória; e (d) os conjugados de medicamentos quimioterápicos ligados a MAb são de ordem de magnitude menos tóxicos em termos sistemáticos do que os conjugados e MAb com radionuclídeos, especialmente para a medula óssea sensível à radiação.

[006] A Camptotecina (CPT) e seus derivativos são uma classe de agentes antitumorais potentes. O Irinotecano (também mencionado como CPT-11) e topotecano são análogos da CPT e são agentes terapêuticos aprovados contra o câncer (Iyer e Ratain, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42: S31-S43 (1998)). As CPTs atuam por inibir a enzima topoisomerase I por estabilizar o complexo topoisomerase I-DNA (Liu, *et al.* em *The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential*, Liehr J.G., Giovanella, B.C. e Verschraegen (eds), NY Acad Sci., NY 922:1-10 (2000)). As CPTs apresentam questões específicas na preparação dos conjugados. Uma questão é a insolubilidade da maioria dos derivativos da CPT em tampões aquosos. Em segundo lugar, as CPTs apresentam desafios específicos para modificação estrutural para conjugação com macromoléculas. Por exemplo, a própria CPT contém apenas um grupo de hidroxila terciária no anel E. O grupo funcional hidroxila no caso da CPT deve ser acoplado a um ligador adequado para conjugação de proteína subsequente; e nos derivativos de CPT potentes, tais como SN-38, o metabólito ativo da CPT-11 quimioterápica e outros derivativos contendo C-10-hidroxila tais como topotecano e 10-hidroxi-CPT, a presença de uma hidroxila fenólica na posição C-10 complica a derivatização necessária de C-20-hidroxila. Em terceiro lugar, a labilidade sob condições fisiológicas da fração de δ -lactona do anel E das camptotecinas resulta em potencia antitumoral altamente reduzida. Portanto, o protocolo de conjugação é realizado de forma a ser conduzido em um pH de 7 ou menor para evitar a abertura do anel de lactona. Entretanto, a conjugação de uma CPT bifuncional que possui um grupo amino-reativo, tal como um éster ativo, geralmente exigiria um pH de 8 ou maior. Em quarto lugar, uma fração intracelularmente clivável é preferencialmente incorporada no ligador/espaçador ligando as CPTs e os anticorpos ou outras frações de ligação.

[007] Existe uma necessidade para métodos mais eficazes de preparação

e administração de conjugados anticorpo-CPT, tais como conjugados anticorpo-SN-38. Preferencialmente, os métodos compreendem programas de dosagem e administração otimizados que maximizam a eficácia e minimizam a toxicidade dos conjugados anticorpo-CPT para uso terapêutico em pacientes humanos.

RESUMO DA INVENÇÃO

[008] Conforme usado neste documento, a abreviação "CPT" pode se referir a camptotecina ou quaisquer dos seus derivativos, tal como SN-38, exceto quando expressamente declarado de outra forma. A presente invenção soluciona uma necessidade não preenchida na arte por fornecer métodos e composições melhoradas para preparar e administrar imunoconjugados CPT-anticorpo. Preferencialmente, a camptotecina é SN-38. Os métodos e composições divulgadas são de uso para o tratamento de uma variedade de doenças e condições que são refratárias ou menos responsivas a outras formas de terapia, e podem incluir doenças das quais os anticorpos adequados ou fragmentos de anticorpos de ligação aos抗ígenos para direcionamento seletivo podem ser desenvolvidos, estão disponíveis ou conhecidos. As doenças ou condições preferenciais que podem ser tratadas com os imunoconjugados em questão incluem, por exemplo, câncer ou doenças causadas por organismos infeciosos.

[009] Preferencialmente, a fração de direcionamento é um anticorpo, fragmento de anticorpo, anticorpo biespecífico ou outro anticorpo multivalente, ou outra molécula ou composto com base em anticorpo. O anticorpo pode ser de vários isótopos, preferencialmente IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, mais preferencialmente, caracterizado pelo fato de compreender uma articulação de IgG1 humana e sequências constantes de região. O anticorpo ou fragmento deste pode ser um anticorpo humano-camundongo quimérico, humano-primata quimérico, humanizado (estrutura humana e regiões

hipervariáveis murinas (CDR)), ou anticorpo completamente humano, bem como variações destes, tais como anticorpos metade IgG4 (mencionados como "unicorpos"), conforme descritos por van der Neut Kolfschoten et al. (*Science* 2007; 317:1554-1557). Mais preferencialmente, o anticorpo ou fragmento deste pode ser criado ou selecionado para compreender sequências de regiões humanas constantes que pertencer a alótipos específicos, que podem resultar em imunogenicidade específica quando o imunoconjunto é administrado a um sujeito humano. Alótipos preferenciais para administração incluem um alótipo não-G1m1 (nG1m1), tal como G1m3, G1m3,1, G1m3,2 ou G1m3,1,2. Mais preferencialmente, o alótipo é selecionado do grupo consistindo de alótipos de nG1m1, G1m3, nG1m1,2 e Km3.

[0010] Anticorpos de uso podem se ligar a qualquer antígeno associado a doença conhecido na técnica. Quando o estado da doença é um câncer, por exemplo, muitos antígenos expressos ou associados com células tumorais são conhecidos na técnica, incluindo, porém não se limitando a, anidrase carbônica IX, alfa-fetoproteína (AFP), α -actinina-4, A3, antígeno específico para anticorpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, BrE3-antígeno, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m., CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 α , antígeno específico de cólon-p (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriônica humana (HCG) e suas subunidades, HER2/neu, HMGB-

1, fator induzido por hipóxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), KC4-antígeno, KS-1-antígeno, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina de câncer pancreático, receptor PD-1, fator de crescimento placentário, p53, PLAGL2, fosfatase ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF- α , antígeno Tn, antígenos Thomson-Friedenreich, antígenos de necrose tumoral, VEGFR, ED-B fibronectina, WT-1, 17-1A-antígeno, fatores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, um marcador de angiogênese, bcl-2, bcl-6, Kras, uma marcador de oncogene e um produto de oncogene (veja, por exemplo, Sensi et al., *Clin Cancer Res* 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., *J Immunol* 2007, 178:1975-79; Novellino et al. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:187-207). Preferencialmente, os anticorpos se ligam a CEACAM5, CEACAM6, EGP-1 (TROP-2), MUC-16, AFP, MUC5a,c, PAM4 antigen, CD74, CD19, CD20, CD22 ou HLA-DR.

[0011] Anticorpos exemplificativos que podem ser usados incluem, porém não se limitam a, hR1 (anti-IGF-1R, Pedido de Patente U.S. N° de série 12/722,645, depositado em 3/12/10), hPAM4 (anti-mucina, Patente U.S. N° 7,282,567), hA20 (anti-CD20, Patente U.S. N° 7,251,164), hA19 (anti-CD19, Patente U.S. N° 7,109,304), hIMMU31 (anti-AFP, Patente U.S. N° 7,300,655), hLL1 (anti-CD74, Patente U.S. N° 7,312,318), hLL2 (anti-CD22, Patente U.S. N° 7,074,403), hMu-9 (anti-CSAp, Patente U.S. N° 7,387,773), hL243 (anti-HLA-DR,

Patente U.S. N° 7,612,180), hMN-14 (anti-CEACAM5, Patente U.S. N° 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, Patente U.S. N° 7.541.440), hRS7 (anti-EGP-1, Patente U.S. N° 7.238.785), hMN-3 (anti-CEACAM6, Patente U.S. N° 7.541.440), Ab124 e Ab125 (anti-CXCR4, Patente U.S. N° 7.138.496), a seção de Exemplos de cada patente ou pedido citado incorporada aqui por referência. Mais preferencialmente, o anticorpo é IMMU-31 (anti-AFP), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-3 (anti-CEACAM6), hMN-15 (anti-CEACAM6), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), hL243 ou IMMU-114 (anti-HLA-DR), hA19 (anti-CD19) ou hA20 (anti-CD20). Conform usado neste documento, os termos epratuzumabe e hLL2 são intercambiáveis, da mesma forma que os termos veltuzumabe e hA20, hL243g4P, hL243gamma4P e IMMU-114.

[0012] Anticorpos alternativos de uso incluem, porém não se limitam a, abciximabe (antiglicoproteína IIb/IIIa), alemtuzumabe (anti-CD52), bevacizumabe (anti-VEGF), cetuximabe (anti-EGFR), gentuzumabe (anti-CD33), ibritumomabe (anti-CD20), panitumumabe (anti-EGFR), rituximabe (anti-CD20), tositumomabe (anti-CD20), trastuzumabe (anti-ErbB2), lambrolizumabe (receptor anti-PD-1), nivolumabe (receptor anti-PD-1), ipilimumabe (anti-CTLA-4), abagovomabe (anti-CA-125), adecatumumabe (anti-EpCAM), atlizumabe (receptor anti-IL-6), benralizumabe (anti-CD125), obinutuzumabe (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, Pedido de Patente U.S. 11/983,372, depositado como ATCC PTA-4405 e PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, WO 2009/130575), tocilizumabe (receptor anti-IL-6), basiliximabe (anti-CD25), daclizumabe (anti-CD25), efalizumabe (anti-CD11a), GA101 (anti-CD20; Glycart Roche), muromonabe-CD3 (receptor anti-CD3), natalizumabe (integrina anti- α 4), omalizumabe (anti-IgE); anticorpos anti-TNF- α tais como CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximabe (Centocor, Malvern,

PA), certolizumabe pegol (UCB, Brussels, Belgium), anti-CD40L (UCB, Brussels, Belgium), adalimumabe (Abbott, Abbott Park, IL), Benlysta (Human Genome Sciences); anticorpos para terapia da doença de Alzheimer tais como Alz 50 (Ksiezak-Reding et al., 1987, *J Biol Chem* 263:7943-47), gantenerumabe, solanezumabe e infliximabe; anticorpos anti-fibrina como 59D8, T2G1s, MH1; anticorpos anti-CD38 tais como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) ou daratumumabe (Johnson & Johnson); (anticorpos anti-HIV tais como P4/D10 (U.S. Patent 8.333.971), Ab 75, Ab 76, Ab 77 (Paulik et al., 1999, *Biochem Pharmacol* 58:1781-90), bem como os anticorpos anti-HIV descritos e vendidos pela Polymun (Vienna, Austria), descritos na U.S. Patent 5.831.034, U.S. Patent 5.911.989, e Vcelar et al., *AIDS* 2007; 21(16):2161-2170 e Joos et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(5):1773-9, tudo incorporado aqui por referência; e anticorpos contra patógenos tais como CR6261 (anti-influenza), exbivirumabe (anti-hepatite B), felvizumabe (vírus sincicial anti-respiratório), foravirumabe (vírus anti-raiva), motavizumabe (vírus sincicial anti-respiratório), palivizumabe (vírus sincicial anti-respiratório), panobacumabe (anti-Pseudomonas), rafivirumabe (vírus anti-raiva), regavirumabe (anti-citomegalovírus), sevirumabe (anti-citomegalovírus), tivirumabe (anti-hepatite B), e urtoxazumabe (anti-*E. coli*).

[0013] Em uma modalidade preferencial, a fração quimioterápica é selecionada de camptotecina (CPT) e seus análogos e derivativos e é mais preferencialmente SN-38. Contudo, outras frações quimioterápicas que podem ser usadas incluem taxanos (por exemplo, baccatina III, taxol), epotilonas, antraciclinas (por exemplo, doxorrubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorubicina (morfolina-DOX), cianomorfolina-doxorrubicina (cianomorfolina-DOX), 2-pirrolinodoxorrubicina (2-PDOX) ou uma forma de pró-fármaco 2-PDOX (pro-2-PDOX); *vide exemplo*, Priebe W (ed.), ACS

symposium series 574, publicado por American Chemical Society, Washington D.C., 1995 (332pp) e Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2464-2469, 1996), ansamicinas benzoquinóides exemplificadas por geldanamicina (DeBoer *et al.*, *Journal of Antibiotics* 23:442-447, 1970; Neckers *et al.*, *Invest. New Drugs* 17:361-373, 1999), e semelhantes. Preferencialmente, o anticorpo ou fragmento deste que se liga a, pelo menos, uma fração quimioterápica; preferencialmente 1 para cerca de 5 frações quimioterápicas; mais preferencialmente 6 ou mais frações quimioterápicas, mais preferencialmente cerca e 6 a 12 frações quimioterápicas.

[0014] Um exemplo de um derivativo de CPT solúvel em água é CPT-11. Dados clínicos extensos estão disponíveis concernente à farmacologia da CPT-11 e sua conversão *in vivo* para a SN-38 ativa (Iyer e Ratain, *Cancer Chemother Pharmacol.* 42:S31-43 (1998); Mathijssen *et al.*, *Clin Cancer Res.* 7:2182-2194 (2002); Rivory, *Ann NY Acad Sci.* 922:205-215, 2000)). A SN-38 na forma ativa é cerca de 2 a 3 ordens de magnitude mais potente que a CPT-11. Em modalidades preferenciais específicas, o imunoconjunto pode ser um conjugado de hMN-14-SN-38, hMN-3-SN-38, hMN-15-SN-38, IMMU-31-SN-38, hRS7-SN-38, hA20-SN-38, hL243-SN-38, hLL1-SN-38 ou hLL2-SN-38.

[0015] Várias modalidades podem relacionar o uso dos métodos e composições em questão para tratar um câncer, incluindo, porém não limitado a, linfomas não-Hodgkin, leucemias linfóides agudas e crônicas de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma de célula B grande agudo, leucemia de células pilosas, leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfomas e leucemias de células T, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, carcinomas, melanomas, sarcomas, gliomas, câncer ósseo e de pele. Os carcinomas podem incluir carcinomas da cavidade oral, esôfago, trato

gastrointestinal, trato pulmonar, pulmão, estômago, cólon, mamas, ovário, próstata, útero, endométrio, cólo do útero, bexiga urinária, pâncreas, osso, cérebro, tecido conectivo, fígado, vesícula biliar, bexiga urinária, rins, pele, sistema nervoso central e testículos.

[0016] Além disso, os métodos e composições em questão podem ser usados para tratar uma doença infecciosa, por exemplo doenças envolvendo infecção por patógenos tais como bactérias, rickettsia, micoplasma, protozoários, fungos, vírus, parasitas ou outros agentes microbianos. Os exemplos incluem vírus da imunodeficiência humana (HIV) que causa AIDS, *Mycobacterium* de tuberculose, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *HemophiLys influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas da doença de Lyme, Vírus do Nilo Ocidental, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, vírus da raiva, vírus influenza, citomegalovírus, vírus da herpes simples tipo I, vírus da herpes simples tipo II, parvovírus de soro humano, vírus sincicial respiratório, vírus da herpes zóster, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus do sarampo, adenovírus, vírus da leucemia em célula T humana, vírus Epstein-Barr, vírus da leucemia murina, vírus da caxumba, vírus da estomatite vesicular, vírus da sindbis, vírus da coriomeningite linfocítica, vírus da verruga, vírus da língua azul, vírus Sendai, vírus da leucemia felina, reovírus, poliovírus, vírus símio 40, vírus do tumor mamário do camundongo, vírus da dengue, vírus da rubéola, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania*

tropica, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* e *M. pneumoniae*. Uma revisão alistando os anticorpos contra organismos infecciosos (antitoxina e anticorpos antiviriais), bem como outros alvos, pode se encontrada em Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1):5-15, incorporada no presente documento por referência.

[0017] Em determinadas modalidades envolvendo o tratamento do câncer, os conjugados de medicamentos podem ser usados em combinação com cirurgia, terapia por radiação, quimioterapia, imunoterapia com anticorpos puros, radioimunoterapia, imunomoduladores, vacinas e semelhantes. Estes terapias em combinação podem permitir doses menores de cada agente terapêutico a ser dado nestas combinações, sendo assim, reduzindo determinados efeitos colaterais graves e reduzindo potencialmente os cursos da terapia exigida. Quando não há sobreposição de toxicidade ou quando está é mínima, doses completas de cada uma também podem ser administradas.

[0018] Em doenças infecciosas, os imunoconjugados de medicamente podem ser combinados com outros medicamentos terapêuticos, imunomoduladores, MAbs puras ou vacinas (por exemplo, MAbs contra hepatite, HIV, ou vírus do papiloma ou vacinas com base e imunógenos destes vírus ou inibidores de quinase, tais como na hepatite B). Anticorpos e vacinas com base em antígenos contra estes e outros patógenos virais são conhecidos na técnica e, em alguns casos, já são aplicados no uso comercial. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais antiinfecciosos foram revisados por Reichert e Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006; 5:191-195), incorporados neste documento por referência, que resumem os patógenos prioritários

contra os quais a terapia com anticorpos simples foram investidas, resultando em apenas 2 patógenos contra os quais os anticorpos se encontram na Fase III dos testes clínicos ou estando sendo comercializados (vírus sincicial respiratório e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), com 25 outros em estudos clínicos e 20 descontinuados durante estudo clínico. Para terapia com combinação, o uso de radioimunoterapia para tratamento de organismos infecciosos é divulgada, por exemplo, na Patente U.S. N° 4,925,648; 5,332,567; 5,439,665; 5,601,825; 5,609,846; 5,612,016; 6,120,768; 6,319,500; 6,458,933; 6,548,275; e na Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 20020136690 e 20030103982, a seção de exemplos de cada um é incorporada neste documento por referência.

[0019] A dose ideal preferencial de imunoconjugados pode incluir uma dosagem entre 3 mg/kg e 20 mg/kg, preferencialmente, dado semanalmente, duas vezes na semana ou a cada outras semanas. O cronograma de dosagem ideal pode incluir ciclos de tratamento de duas semanas consecutivas de terapia seguidas por uma, duas, três ou quatro semanas de descanso, ou semanas alternadas de terapia e descanso, ou uma semana de terapia seguida por duas, três ou quatro semanas de descanso, ou três semanas de terapia seguidas por uma, duas, três ou quatro semanas de descanso, ou quatro semanas de terapia seguidas por uma, duas, três ou quatro semanas de descanso, ou cinco semanas de terapia seguidas por uma, duas, três, quatro ou cinco semanas de descanso, ou administração uma vez a cada duas semanas, um vez a cada três semanas ou uma vez ao mês. O tratamento pode ser estendido por qualquer número de ciclos, preferencialmente, pelo menos 2, pelo menos 4, pelo menos 6, pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, ou pelo menos 16 ciclos. A dosagem pode ser de até 24 mg/kg. Dosagens exemplificativas do uso podem incluir 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4

mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg e 24 mg/kg. Dosagens preferenciais são 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16 ou 18 mg/kg. A pessoa versada na técnica perceberá que uma variedade de fatores, tais como idade, saúde geral, funcionamento específico do órgão ou peso, bem como efeitos de terapia anteriores sobre sistemas específicos de órgãos (por exemplo, medula óssea) podem ser considerados na seleção de uma dosagem ideal de imunoconjungados, e que a dosagem e/ou frequência de administração pode ser aumentada ou diminuída durante o curso da terapia. A dosagem pode ser repetida conforme necessário, com evidência de encolhimento do tumor observado após apenas 4 a 8 doses. As dosagens e cronogramas de administração otimizados divulgados neste instrumento mostram eficácia superior inesperada e toxicidade reduzida em sujeitos humanos que não poderiam ter sido previstas em estudos com modelos animais. De forma surpreendente, a eficácia superior permite o tratamento de tumores que foram anteriormente considerados como resistentes a uma ou mais terapias anti-câncer padronizadas, CPT-11, dais quais a SN-38 é derivada *in vivo*.

[0020] Os métodos em questão podem incluir uso de CT e/ou PET/CT ou MRI para medir a resposta tumoral em intervalos regulares. Níveis sanguíneos de marcadores tumorais, tais como CEA (antígeno carcinoembionario), CA19-9, AFP, CA 15.3, or PSA, também podem ser monitorados. Cronogramas de dosagens e/ou administração podem ser ajustados conforme necessário de acordo com os resultados de processamento de imagens e/ou níveis sanguíneos do marcador.

[0021] Um resultado surpreendente com as composições e métodos imediatos reivindicados é a tolerabilidade inesperada de doses altas do

conjugado anticorpo-droga, mesmo com infusões repetidas, apenas com toxicidades de baixo grau relativo de náuseas e vômitos observados ou neutropenia gerenciável. Um resultado adicional surpreendente é a falta de acumulação do conjugado anticorpo-droga, diferente de outros produtos que possuem SN-38 conjugado a albumina, PEG ou outros transportadores. A falta de acumulação está associada com tolerabilidade melhorada e falta de toxicidade grave mesmo após dosagem repetida ou aumentada. Estes resultados surpreendentes permitem a otimização da dosagem e cronograma de administração, com eficácia surpreendentemente altas e baixas toxicidades. Os métodos reivindicados apresentam o encolhimento de tumores sólidos em indivíduos com câncer anteriormente resistentes, de 15% ou mais, preferencialmente 20% ou mais, preferencialmente 30% ou mais, mais preferencialmente 40% ou mais em tamanho (conforme medido pelo diâmetro mais longo). A pessoa versada na técnica perceberá que o tamanho do tumor pode ser medido por uma variedade de técnicas diferentes, tais como volume total do tumor, tamanho máximo do tumor em qualquer dimensão ou uma combinação de medições de tamanho em várias dimensões. Isto pode estar de acordo com procedimento radiológicos padronizados, tais como tomografia computadorizada, ultrassonografia e/ou tomografia por emissão de pósitrons. Os meios para medição de tamanho são menos importantes do que observar uma tendência de diminuição do tamanho do tumor com tratamento de imunoconjugados, preferencialmente resultando na eliminação do tumor.

[0022] Enquanto que o imunoconjugado pode ser administrado como uma injeção periódica em bolus, em modalidades alternativas, o imunoconjugado pode ser administrado por infusão contínua de conjugados anticorpo-medicamente. A fim de aumentar o Cmax e estender o PK do imunoconjugado no sangue, uma infusão contínua pode ser administrada por

exemplo por cateter de demora. Tais dispositivos são conhecidos na técnica, tais como catereres de HICKMAN®, BROVIAC® ou PORT-A-CATH® (vide por exemplo, Skolnik et al., *Ther Drug Monit* 32:741-48, 2010) bem como qualquer ou cateter de demora conhecido pode ser usado. Uma variedade de bombas de infusão contínua também são conhecidas na técnica e qualquer outra bomba de infusão conhecida pode ser usada. O alcance da dosagem para infusão contínua pode estar entre 0,1 e 0,3 mg/kg por dia. Mais preferencialmente, estes imunoconjugados podem ser administrados por infusões intravenosas acima dos períodos relativamente curtos de 2 a 5 horas, mais preferencialmente de 2 a 3 horas.

[0023] Em modalidades preferenciais em especial, os imunoconjugados e cronogramas de dosagens pode ser eficazes em pacientes resistentes a terapias padronizadas. Por exemplo, um imunoconjugado hMN-14-SN-38 pode ser administrado para um paciente que não tenha respondido a terapia anterior com irinotecano, o agente precursor SN-38. Surpreendentemente, o paciente resistente a irinotecano pode mostrar uma resposta parcial ou mesmo completa a hMN-14-SN-38. A capacidade do imunoconjugado para direcionar especificamente o tecido tumoral pode suplantar a resistência do tumor por direcionamento melhorado e administração aprimorada do agente terapêutico. Alternativamente, um imunoconjugado anti-CEACAM5, tal como hMN-14, pode ser administrado com um imunoconjugado anti-CEACAM6, tal como hMN-3 ou hMN-15. Outros imunoconjugados anticorpo-SN-38 podem demonstrar eficácia melhorada semelhante e/ou toxicidade diminuída comparada a tratamentos terapêuticos alternativos padronizados e combinações de imunoconjugados SN-38 diferentes ou conjugados SN-38-anticorpo em combinação com um anticorpo conjugado a um radionuclídeo, toxina ou outra droga pode fornecer ainda mais eficácia melhorada e/ou toxicidade reduzida. Um sujeito

preferencialmente específico pode ser um paciente com câncer de cólon metastático, um paciente com câncer de mama triplo-negativo, um paciente com câncer de mama e HER+, ER+, progesterona+, um paciente com câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), um paciente com câncer pancreático metastático, um paciente com carcinoma de células renais metastáticas, uma paciente com câncer gástrico metastático, um paciente com câncer de próstata metastático ou um paciente com câncer de pulmão de células pequenas metastáticas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0024] A **FIG. 1.** *Terapia In vivo* de camundongo nude atímico portando carcinoma pancreático humano Capan 1 com conjugados de MAb-CL2A-SN-38.

[0025] A **FIG. 2.** *Terapia In vivo* de camundongo nude atímico portando carcinoma pancreático humano BxPC3 com conjugados de MAb-CL2A-SN-38.

[0026] A **FIG. 3.** *Terapia In vivo* de camundongo nude atímico portando carcinoma de cólon humano LS174T com conjugados de hMN-14-CL2A-SN-38.

[0027] A **FIG. 4.** Curvas de sobrevivência de camundongo tratado com hMN14-CL-SN-38 portando doença do pulmão metastático GW-39.

[0028] A **FIG. 5.** A eficácia terapêutica de hRS7-SN-38 ADC em vários modelos de doença de tumor em xenoenxerto sólido. A eficácia do tratamento de hRS7-CL2-SN-38 e hRS7-CL2A-SN-38 ADC foi estudada em camundongos portando xenoenxertos tumorais de células escamosas de pulmão, pancreáticas, coloretais e não-pequenas de pulmão. Todas as ADCs e controles foram administrados nas quantidades indicadas (expressas como quantidade de SN-38 por dose; setas longas = injeções de conjugados, setas curtas = injeções de irinotecano). **(A)** Camundongos portando tumores Calu-3 ($N = 5-7$) foram injetados com hRS7-CL2-SN-38 a cada 4 dias por um total de 4 injeções (q4dx4). **(B)** Camundongos portando tumores COLO 205 ($N = 5$) foram injetados

8 vezes (q4dx8) com a ADC ou a cada 2 dias por um total de 5 injeções (q2dx5) com a MTD de irinotecano. **(C)** Camundongos portando tumores Capan-1 ($N = 10$) ou **(D)** BxPC-3 ($N = 10$) foram tratados duas vezes semanalmente por 4 semanas com os agentes indicados. **(E)** Além do ADC dado duas vezes semanalmente por 4 semanas, camundongos portando tumores SK-MES-1 ($N = 8$) receberam a MTD de CPT-11 (q2dx5).

[0029] A **FIG. 6.** Eficácia comparativa dos conjugados de epratuzumabe (Emab)-SN-38 e veltuzumabe (Vmab)-SN-38 no modelo subcutâneo de Ramos. Camundongos nude ($N = 10$ por grupo) com tumores de média aproximada de $0,35\text{ cm}^3$ ($0,20\text{--}0,55\text{ cm}^3$) foram administrados 0,25 ou 0,5 mg de cada conjugado duas vezes semanalmente por 4 semanas.

[0030] A **FIG. 7.** Especificidade do conjugado Emab anti-CD22-SN-38 (linha sólida) versus um conjugado irrelevante labetuzumabe (Lmab)-SN-38 (linha pontilhada) em camundongos nude portando tumores subcutâneos de Ramos. Os animais receberam duas doses semanais dos conjugados intraperitonealmente por 4 semanas. **A, B, e C** receberam 75, 125, e 250 μg de cada conjugado por dose (54,5, 91, e 182 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de SN-38, respectivamente, com base no peso médio de 22 g). A sobrevivência com base no tempo até a progressão (TTP) para $3,0\text{ cm}^3$, com tumores iniciando com um tamanho médio de $0,4\text{ cm}^3$. Os valores P comparando a sobrevivência média (mostrada) para Emab-SN-38 para conjugado Lmab-SN-38 são mostradas em cada painel. C, curvas de sobrevivência (cinza sólido) para outro grupo de animais foram dadas injeções intraperitoneais semanalmente de irinotecano (6,5 $\mu\text{g}/\text{dose}$; SN-38 equivale aproximadamente ao mesmo que 250- μg de dose do conjugado Emab-SN-38).

[0031] A **FIG. 8.** Histórico de tratamento anterior do paciente antes da administração de IMMU-130 (labetuzumabe-NS-38). O tratamento anterior

incluiu colectomia/hepatectomia de CRC fase IV (lobo parcial), terapia de ablação por radiofrequência de metástases do fígado, ressecção em cunha de metástases do fígado e quimioterapia com irinotecano/oxaliplatina, Folfirinox, Folfirinox + bevacizumabe, bevacizumabe + 5-FU/leucovorina, FolFiri, Folfiri + cetuximabe e cetuximabe sozinho. O paciente recebeu doses de 16 mg/kg e IMMU-132 por infusão lenta IV a cada semana por um total de 17 doses de tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

[0032] Na descrição que se segue, inúmeros termos são usados e as definições a seguir são fornecidas para facilitar o entendimento do assunto reivindicado. Os termos que não são expressamente definidos neste documento são usados de acordo com seus significados simples e comuns.

[0033] Exceto quando especificado de outra forma, um ou uma significa "um ou mais".

[0034] O termo cerca de é usado neste documento para significar mais ou menos dez por cento (10%) de um valor. Por exemplo, "cerca de 100" refere-se a qualquer número entre 90 e 110.

[0035] Um anticorpo, conforme usado neste documento, refere-se a uma molécula de imunoglobulina (por exemplo, um anticorpo IgG) de comprimento total (ou seja, naturalmente ocorrendo ou formada por processos recombinatórios de fragmento de gene de imunoglobulina normal) ou uma parte de ligação com antígeno de uma molécula de imunoglobulina, tal como um fragmento de anticorpo. Um anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser conjugado ou derivatizado dentro do escopo do assunto reivindicado. Tais anticorpos incluem, porém não se limitam a, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (e subformas de IgG4), bem como isótopos de IgA. Conforme usado abaixo, a

abreviação "MAb" pode ser usada intercambiavelmente para se referir a um anticorpo, fragmento de anticorpo, anticorpo monoclonal ou anticorpo multiespecífico.

[0036] Um fragmento de um anticorpo é uma parte de um anticorpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ (Fv de cadeia única), anticorpos de domínio único (DABs or VHVs) e semelhantes, incluindo meias moléculas de IgG4 citadas acima (van der Neut Kolfschoten et al. (Science 2007; 317(14 Sept):1554-1557). Independente da estrutura, um fragmento de anticorpo de uso se liga com o mesmo antígeno que é reconhecido pelo anticorpo intacto. O termo "fragmento de anticorpo" também inclui proteínas sintéticas ou geneticamente manipuladas que atuam como um anticorpo por se ligarem a um antígeno específico para formar um complexo. Por exemplo, fragmentos de anticorpos incluem fragmentos isolados, consistindo de regiões variáveis, tais como os fragmentos "Fv" consistindo das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, e as moléculas de polipeptídeo da cadeia recombinante única em que regiões variáveis leves e pesadas são conectadas por um ligador de peptídeo ("proteínas scFv"). Os fragmentos podem ser construídos em diferentes formas para resultar em formas multivalentes e/ou multiespecíficas de ligação.

[0037] Um anticorpo puro em geral é um anticorpo inteiro que não está conjugado a um agente terapêutico. Um anticorpo puro pode exibir efeitos terapêuticos e/ou citotóxicos, por exemplo, por funções Fc-dependentes, tais como fixação de complemento (CDC) e ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo). Contudo, outros mecanismos tais como apoptose, anti-angiogênese, atividade anti-metastática, atividade anti-adesão, inibição de adesão heterotípica ou homotípica e interferência nos caminhos de sinalização também podem apresentar um efeito terapêutico. Anticorpos puros incluem anticorpos policlonais ou monoclonais, anticorpos de ocorrência natural ou

recombinantes, tais como anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos e fragmentos destes. Em alguns casos, um "anticorpo puro" também pode se referir a um fragmento de anticorpo "puro". Conforme definido neste documento, "puro" é sinônimo de "não conjugado" e significa não ligado ou conjugado a um agente terapêutico.

[0038] Um anticorpo quimérico é uma proteína recombinante que contém os domínios variáveis das cadeias de anticorpo pesada e leve, incluindo as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo derivado de uma espécie, preferencialmente, um anticorpo de roedor, mais preferencialmente um anticorpo de murino, enquanto que os domínios constantes da molécula do anticorpo são derivados daqueles de um anticorpo humano. Para aplicações veterinárias, os domínios constantes do anticorpo quimérico podem ser derivados de domínios de outras espécies, tais como um primata, gato ou cão.

[0039] Um anticorpo humanizado é uma proteína recombinante na qual as CDRs de um anticorpo de uma espécie; por exemplo, um anticorpo murino, são transferidas de cadeias variáveis pesadas e leves de anticorpos murinos em domínios variáveis pesados e leves de humanos (regiões de estrutura). Os domínios constantes da molécula de anticorpos são derivados dos domínios de um anticorpo humano. Em alguns casos, resíduos específicos da região da estrutura de anticorpos humanizados, especialmente aqueles que são semelhantes ou próximos às sequências de CDR podem ser modificados, por exemplo, substituídos com os resíduos correspondentes aos anticorpos de murino, roedor, primata sub-humano ou outro.

[0040] Um anticorpo humano é um anticorpo obtido, por exemplo, de camundongos transgênicos que foram "manipulados" para produzir anticorpos humanos em resposta a desafios antigênicos. Nesta técnica, elementos do local

da cadeia pesada e leve de humanos são introduzidos em cepas de camundongos derivados de linhas celulares de cepas embrionárias que contém rupturas direcionadas de locais de cadeia pesada e cadeia leve endógena. O camundongo transgênico pode sintetizar anticorpos humanos específicos para vários抗ígenos e o camundongo pode ser usado para produzir hibridomas que secretam anticorpos. Os métodos para obtenção de anticorpos humanos a partir de camundongos transgênicos são descritos por Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856 (1994), e Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994). Um anticorpo completamente humano também pode ser construído por métodos de transfecção genética ou cromossomal, dos quais todos são conhecidos na técnica. Veja por exemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990) para a produção de anticorpos humanos e fragmentos destes *in vitro*, a partir de repertórios de genes de domínios variáveis de imunoglobulina de doadores imunizados. Nesta técnica, os genes de domínio variável de anticorpo humano são clonados em estrutura dentro de um gene de proteína capsidial maior ou menor de um bacteriófago filamentoso e exibido como fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula de fago. Porque a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe aquelas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exposição de fago pode ser executada em uma variedade de formatos; para suas revisões, vide, por exemplo, Johnson e Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:5564-571 (1993). Anticorpos humanos também podem ser gerados por células B ativadas *in vitro*. Vide Patente U.S. Nº 5.567.610 e 5.229.275, a seção de Exemplos de cada um é incorporada aqui por referência.

[0041] Um agente terapêutico é um átomo, molécula ou composto que é útil no tratamento de uma doença. Exemplos de agentes terapêuticos incluem, porém não se limitam a, anticorpos, fragmentos de anticorpos, imunoconjungados, medicamentos agentes citotóxicos, agentes pró-apoptóticos, toxinas, nucleases (incluindo DNAses e RNAses), hormônios, imunomoduladores, quelantes, compostos de boro, agentes ou corantes fotoativos, radionuclídeos, oligonuclídeos, interferência de RNA, siRNA, RNAi, agentes antigiogênicos, agentes quimioterápicos, citocinas, quimiocinas, pró-fármacos, enzimas, proteínas ou peptídeos de ligação ou combinações destes.

[0042] Um imunoconjungado é um anticorpo, fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno, complexo de anticorpo ou proteína de fusão de anticorpo que é conjugada a um agente terapêutico. A conjugação pode ser covalente ou não covalente. Preferencialmente, a conjugação é covalente.

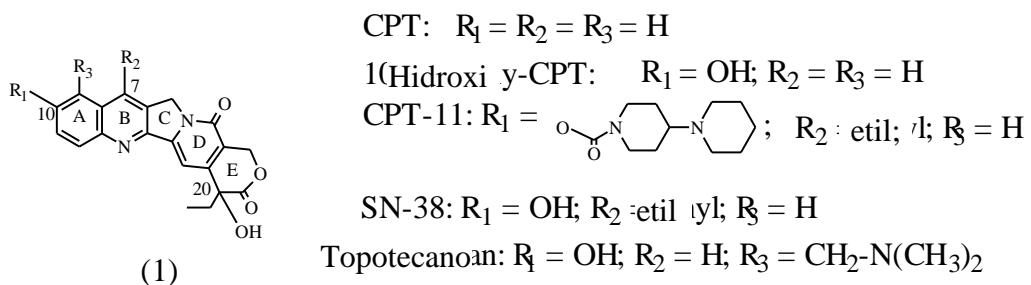
[0043] Conforme usado neste documento, o termo proteína de fusão com anticorpo é uma molécula de ligação com antígeno produzida de forma recombinante na qual um ou mais anticorpos, anticorpos de cadeia única ou fragmentos de anticorpos são ligados a outras frações, tais como uma proteína ou peptídeo, uma toxina, uma citocina, um hormônio, etc. Em determinadas modalidades preferenciais, a proteína de fusão podem compreender duas ou mais do mesmo anticorpo ou anticorpo diferente, fragmentos de anticorpo ou anticorpos de cadeia única fundidos conjuntamente, que podem ser ligar ao mesmo epítopo, epítopos diferentes no mesmo antígeno ou antígenos diferentes.

[0044] Um imunomodulador é um agente terapêutico que, quando presente, altera, suprime ou estimula o sistema imunológico do corpo. Tipicamente, um imunomodulador de uso estimula células imunes a se proliferarem ou se tornarem ativas em uma cascata de respostas imunes, tais

como macrófagos, células dendríticas, células B e/ou células T. Contudo, em alguns casos um imunomodulador pode suprimir a proliferação ou ativação de células imunes. Um exemplo de um imunomodulador, conforme descrito no presente documento é uma citocina, que é uma proteína pequena solúvel de aproximadamente 5-20 kDa que é liberada por uma população celular (por exemplo, linfócitos T osmocondicionados) em contato com antígenos específicos e que atuam como um mediador intercelular. Conforme o versado na técnica entenderá, exemplos de citocinas incluem linfocinas, monocinas, interleucinas e várias moléculas de ligação relacionadas, tais como um fator de necrose tumoral (TNF) e interferons. As quimiocinas são um subconjunto de citocinas. Determinadas interleucinas e interferons são exemplos de citocinas que estimulam células T ou proliferação de outras células imunes. Interferons exemplificativos incluem interferon- α , interferon- β , interferon- γ e interferon- λ .

[0045] CPT é uma abreviação para camptotecina e, conforme usado na presente aplicação, CPT representa a própria camptotecina ou um análogo ou derivativo da camptotecina, tal como SN-38. As estruturas da camptotecina e alguns dos seus análogos com a numeração indicada e anéis rotulados com as letras A-E são dadas na fórmula 1 no Gráfico 1 abaixo.

[0046] Gráfico 1



Conjugados de Camptotecina

[0047] Métodos e composições não limitantes para preparação de imunoconjugados compreendem um agente terapêutico de camptotecina ligado a um anticorpo ou fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno são

descritos abaixo. Em modalidades preferenciais, a solubilidade do medicamento é aumentada por alocar uma fração definida de polietilenoglicol (PEG) (por exemplo, um PEG contendo um número definido de unidades monoméricas) entre o medicamento e o anticorpo, caracterizado pelo fato de que o PEG definido é um PEG de peso molecular baixo, preferencialmente, contendo unidades monoméricas de 1 a 30, mais preferencialmente, contendo unidades monoméricas de 1 a 12.

[0048] Preferencialmente, um primeiro ligador conecta o medicamento a uma extremidade e pode terminar com um acetileno ou um grupo azida na outra extremidade. O primeiro ligador pode compreender uma fração de PEG definida com um grupo azida ou acetileno em uma extremidade e um grupo reativo diferente, tal como ácido carboxílico ou grupo hidroxil na outra extremidade. O PEG definido multifuncional mencionado pode ser ligado ao grupo amina de um aminoálcool e o grupo hidroxil do último pode ser ligado ao grupo hidroxil no medicamento na forma de um carbonato. Alternativamente, a fração de não azida (ou acetileno) do PEG bifuncional definido mencionado é opcionalmente ligado ao N-terminal de um L-amino ácido ou um polipeptídeo com o C-terminal ligado ao grupo amino do aminoálcool e o grupo hidróxi do último é ligado ao grupo hidroxil do medicamento na forma de carbonato ou carbamato, respectivamente.

[0049] Um segundo ligador compreendendo um grupo de acoplamento com anticorpo e um grupo reativo complementar ao grupo azida (ou acetileno) do primeiro ligador, ou seja, acetileno (ou azida), pode reagir com o conjugado medicamento-(primeiro ligador) através da reação de cicloadição acetileno-azida para fornecer um produto do medicamento bifuncional final que é útil para conjugar com anticorpos de direcionamento a doenças. O grupo de acoplamento com anticorpo é preferencialmente um tiol ou um grupo reativo a

tiol.

[0050] Métodos de regeneração seletiva do grupo 10-hidroxil na presença do carbonato C-20 nas preparações do precursor medicamento-ligador envolvendo análogos de CPT tal como SN-38 são apresentados abaixo. Outros grupos protetores para grupos hidroxil reativos nos medicamentos tais como o hidroxil fenólico em SN-38, por exemplo, t-butildimetilsilil ou t-butildifenilsilil, também podem ser usados, e estes são desprotegidos por fluoreto de tetrabutilâmônio antes da ligação com o medicamento derivatizado a uma fração de acoplamento com anticorpo. O grupo 10-hidroxil dos análogos de CPT é protegido alternativamente como um éster ou carbonato, exceto 'BOC', de forma que o CPT bifuncional é conjugado a um anticorpo sem desproteção anterior deste grupo de protetores. O grupo de protetores é imediatamente desprotegido sob condições de pH fisiológico após o bioconjugado ser administrado.

[0051] No acoplamento acetileno-azida, mencionado como "química click" a parte azida pode estar no L2 com a parte acetileno em L3. Alternativamente, L2 pode conter acetileno com L3 contendo azida. 'Química click' se refere a uma reação de cicloadição de cobre (+1)-catalizado entre uma fração de acetileno e uma fração de azida (Kolb HC e Sharpless KB, *Drug Discov Today* 2003; 8: 1128-37), entretanto, as formas alternativas da química click são conhecidas e podem ser usadas. A química click acontece em solução aquosa em condições de pH quase neutro e, sendo assim, é possível de conjugação com medicamento. A vantagem da química click é que ela é quimioseletiva e complementa outros elementos químicos de conjugação bem conhecidos tais como reação de tiol-maleimida

[0052] Enquanto que a presente aplicação tem foco no uso de anticorpos ou fragmentos de anticorpos como frações de direcionamento, o versado na

técnica perceberá que onde um conjugado compreender um anticorpo ou fragmento de anticorpo, outro tipo de fração de direcionamento, tal como um aptâmero, avímeros, proteína *Affibody* ou ligante de peptídeos podem ser substituídos.

[0053] Uma modalidade preferencial exemplificativa é direcionada a um conjugado de um derivativo de medicamento e um anticorpo da fórmula geral 2,

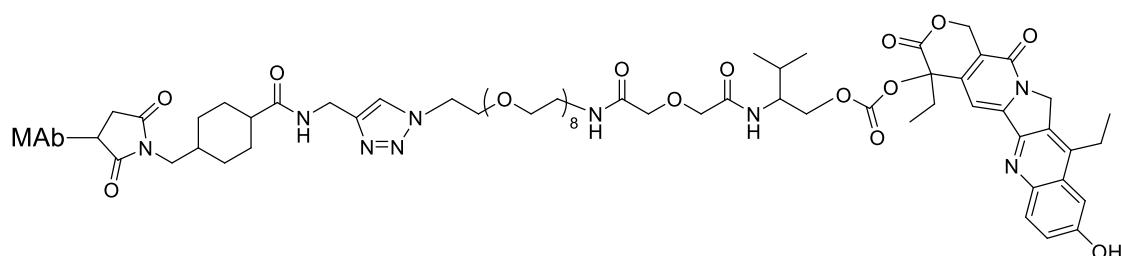


onde MAb é um anticorpo de direcionamento para doença; L2 é componente do ligador transversal compreendendo uma fração de acoplamento com anticorpo e um ou mais grupos de acetileno (ou azida); L1 compreende uma PEG definida com azida (ou acetileno) em uma extremidade, complementar a fração de acetileno (ou azida) em L2 e um grupo reativo tal como ácido carboxílico ou grupo hidroxil na outra extremidade; AA é um L-amino ácido; m é um número inteiro com valores de 0, 1, 2, 3, ou 4; e A' é um espaçador adicional selecionado do grupo de etanolamina, 4-hidroxibenzil álcool, 4-aminobenzil álcool ou etilenodiamina substituída ou não substituída. Os L aminoácidos de 'AA' são selecionados de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina. Caso o grupo A contenha hidroxil este é ligado ao grupo hidroxil ou grupo amina do medicamento na forma de um carbonato ou carbamato, respectivamente.

[0054] Em uma modalidade preferencial da fórmula 2, A' é uma etanolamina substituída derivada de um L-aminoácido, em que o grupo do ácido carboxílico do aminoácido é substituído por uma fração de hidroximetil. A' pode ser derivado de qualquer um dos seguintes L-aminoácidos: alanina,

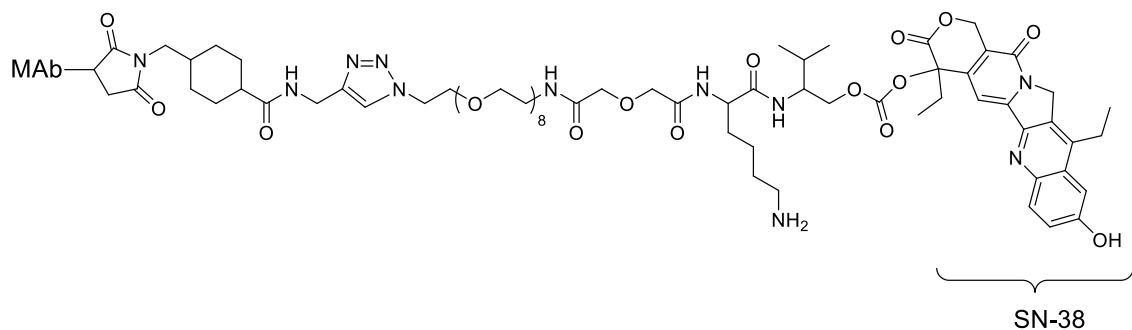
arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

[0055] Em um exemplo de conjugado da modalidade preferencial da fórmula 2, m é 0, A' é L-valinol e o medicamento é exemplificado por SN-38. A estrutura resultante é mostrada na fórmula 3.



(3)

[0056] Em outro exemplo de conjugado da modalidade preferencial da fórmula 2, m é 1 e representado por uma L-lisina derivada, A' é L-valinol e o medicamento é exemplificado por SN-38. A estrutura é mostrada na fórmula 4.



(4)

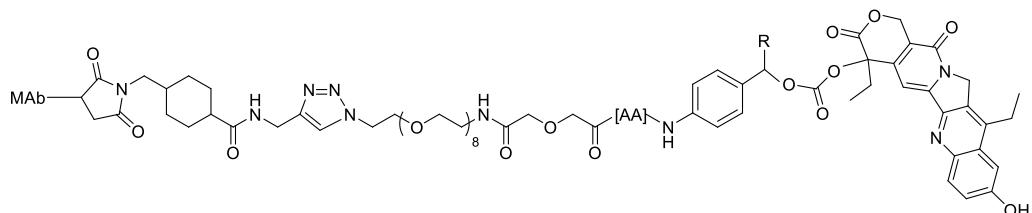
[0057] Nesta modalidade, uma ligação de amida é formada primeiro entre o ácido carboxílico de um amino ácido tal como lisina e o grupo amina e valinol, usando grupos protetores ortogonais para os grupos lisina amina. O grupo protetor sobre o N-terminal de lisina é removido, mantendo o grupo protetor sobre a cadeia lateral da lisina intacta e o N-terminal é acoplado para o grupo carboxil sobre a PEG definida com azida (ou acetileno) na outra extremidade. O grupo hidroxil de valinol é então ligado ao 20-cloroformato derivativo de 10-

hidróxi-protégido SN-38 e este intermediário é acoplado a um componente L2 transportando a fração de ligação com anticorpo bem como o grupo de acetileno complementar (ou azida) envolvido na química click de cicloadição. Finalmente, a remoção dos grupos protetores em ambas cadeias laterais de lisina e SN-38 fornece o produto deste exemplo, mostrado na fórmula 3.

[0058] Enquanto não desejar ser ligado por teoria, o produto MW SN-38, ou seja, carbonato de valinol-SN-38, gerado após proteólise intracelular possui o caminho adicional de liberação de SN-38 intacta através de ciclização intramolecular envolvendo o grupo amina de valinol e o carbonil do carbonato.

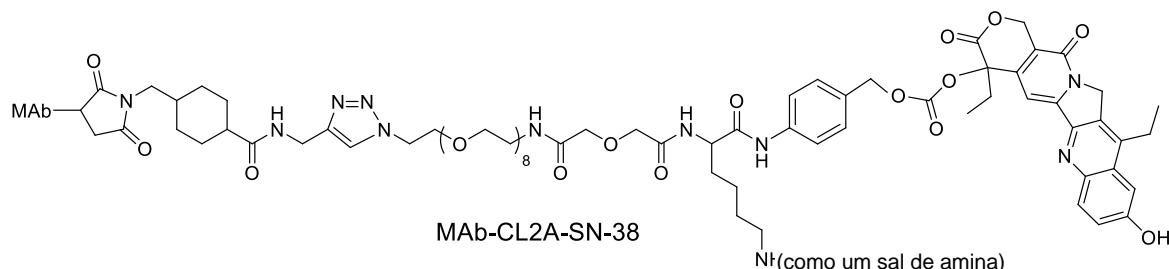
[0059] Em outra modalidade preferencial, A' da fórmula 2 geral é A-OH, onde A-OH é uma fração de colapsível tal como 4-aminobenzil álcool ou um 4-aminobenzil álcool substituído com um grupo alquil C₁-C₁₀ na posição benzílica, e o último, através do seu grupo amina, é ligado a um L-aminoácido ou um polipeptídeo compreendendo até quatro frações de L-aminoácidos; onde o N-terminal é ligado a um ligador transversal terminando no grupo de ligação com anticorpo.

[0060] Um exemplo de uma modalidade preferencial é dada abaixo, onde a modalidade de A-OH do A' da fórmula (2) geral é derivada de 4-aminobenzil álcool substituído, E 'AA' é formado de um L-aminoácido único com m =1 na fórmula geral (2), e o medicamento é exemplificado com SN-38. A estrutura é representada abaixo (fórmula 5, mencionada como MAb-CLX-SN-38). Aminoácido único de AA é selecionado de qualquer um dos seguintes L-aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina. O substituinte R na fração 4-aminobenzil álcool (modalidade A-OH de A') é hidrogênio ou um grupo alquil selecionado de grupos alquil C₁-C₁₀.



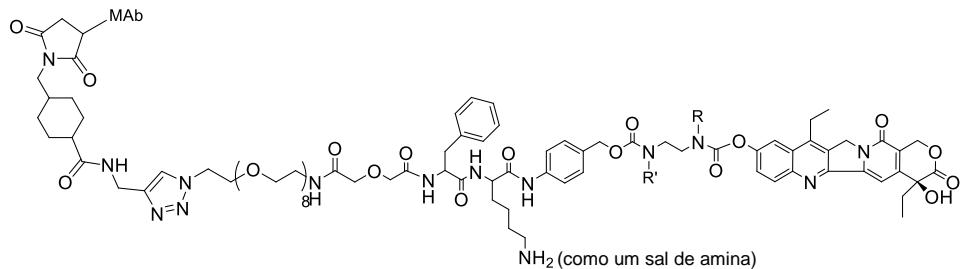
MAb-CLX-SN-38 (5)

[0061] Uma modalidade de MAb-CLX-SN-38 da fórmula 5, onde o aminoácido único AA é L-lisina e R = H, e o medicamento é exemplificado por SN-38 (fórmula 6; mencionada como MAb-CL2A-SN-38).



(6)

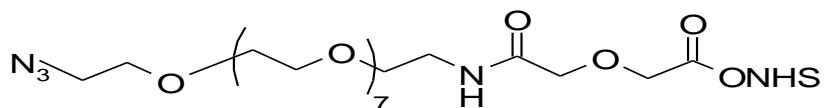
[0062] Outras modalidades são possíveis dentro do contexto de camptotecinas contendo 10-hidroxi, tal como SN-38. No exemplo de SN-38 como o medicamento, o grupo 10-hidroxi mais reativo do medicamento é derivatizado deixando o grupo 20-hidroxil intacto. Dentro da fórmula geral 2, A' é um etilenodiamina substituído. Um exemplo desta modalidade é representada pela fórmula '7' abaixo, onde o grupo hidroxil fenólico de SN-38 é derivatizado como um carbamato com um etilenodiamina substituído, com a outra amina da diamina derivada como um carbamato com um 4-aminobenzil álcool é o grupo amina do último é ligado ao peptídeo Phe-Lys. Nesta estrutura (fórmula 7), R e R' são independentemente hidrogênio ou metil. É mencionado como MAb-CL17-SN-38 or MAb-CL2E-SN-38, quando R = R' = metil.



(7)

[0063] Em uma modalidade preferencial, AA compreende uma fração de polipeptídeo, preferencialmente di, tri ou tetrapeptídeo, que é clivável por peptidase intracelular. Exemplos são: Ala-Leu, Leu-Ala-Leu, e Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet et al., 1982).

[0064] Em outra modalidade preferencial, o componente L1 do conjugado contém um espaçador de polietilenoglicol (PEG) definido com 1–30 unidades monoméricas de repetição. Em uma modalidade preferencial adicional, PEG é um PEG definido com 1–12 unidades monoméricas de repetição. A introdução do PEG pode envolver o uso de derivativos de PEG heterobifuncionalizados que estão comercialmente disponíveis. O PEG heterobifuncional pode conter um grupo azida ou acetileno. Um exemplo de um PEG definido heterobifuncional contendo 8 unidades monoméricas de repetição, com 'NHS' sendo succinimidil, é dado abaixo na fórmula 8:

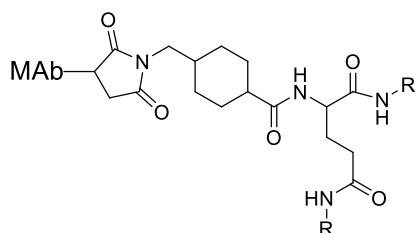


(8)

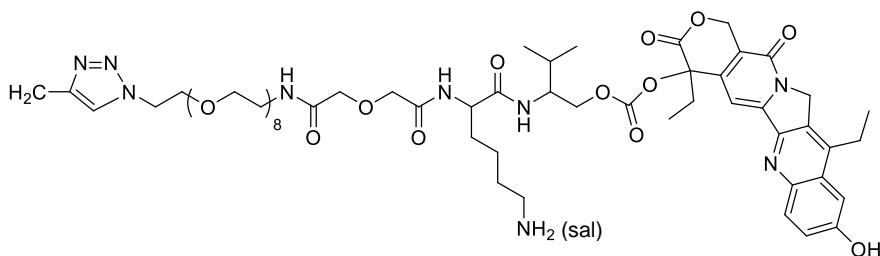
[0065] Em uma modalidade preferencial L2 possui uma pluralidade de grupos acetileno (ou azida), variando de 2–40, mas preferencialmente 2–20, e mais preferencialmente 2–5 e uma única fração de ligação com anticorpo.

[0066] Um conjugado SN-38 representativo de um anticorpo contendo múltiplas moléculas do medicamento e uma única fração de ligação com anticorpo é mostrado abaixo. O componente 'L2' desta estrutura é anexado a 2

grupos de acetileno, resultando na ligação de duas moléculas SN-38 ligadas a azida. A ligação com MAb é representada como uma succinimida.



Em que o resíduo R é:



(9)

[0067] Em modalidades preferenciais, quando o medicamento bifuncional contiver uma fração reativa a tiol como um grupo de ligação com anticorpo, os tiols no anticorpo são gerados nos grupos de lisina do anticorpo usando um reagente tiolante. Os métodos para introdução dos grupos de tiol em anticorpos por modificações de grupos de lisina MAb são bem conhecidos na técnica (Wong em *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991), pp 20-22). Alternativamente, a redução moderada de ligações de dissulfetos intercadeia no anticorpo (Willner et al., *Bioconjugate Chem.* 4:521-527 (1993)) usando agentes de redução tal como ditiotreitol (DTT) pode gerar 7 a 10 tiols no anticorpo que possuem a vantagem de incorporar múltiplas frações do medicamento na região intercadeia da MAb longe da região de ligação com antígeno. Em uma modalidade mais preferencial, a ligação de SN-38 para grupos sulfidril dissulfeto reduzidos resulta na formação de um imunoconjugado anticorpo-SN-38 com 6 frações de SN-38 covalentemente ligadas por molécula de anticorpo. Outros métodos de fornecer resíduos de cisteína para ligação com medicamentos e outros agentes

terapêuticos são conhecidos, tal como o uso de anticorpos modificadores de cisteína (vide Patente U.S. N° 7,521,541, a seção de Exemplos que é incorporada neste documento por referência.)

[0068] Em modalidades preferenciais alternativas, a fração quimioterápica é selecionada do grupo consistindo de doxorrubicina (DOX), epirubicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolinodoxorrubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolino-doxorrubicina (2-PDOX), Pro-2PDOX, CPT, 10-hidroxi camptotecina, SN-38, topotecano, Iurtotecano, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, taxanos, geldanamicina, ansamicinas e epotilonas. Em uma modalidade mais preferencial, a fração quimioterápica é SN-38. Preferencialmente, nos conjugados das modalidades preferenciais, o anticorpo se liga a, pelo menos, uma fração quimioterápica; preferencialmente 1 para cerca de 12 frações quimioterápicas; mais preferencialmente cerca de 6 a 12 frações quimioterápicas.

[0069] Além disso, em uma modalidade preferencial, o componente ligador 'L2' compreende um grupo tiol que reage com um resíduo reativo a tiol introduzido em um ou mais grupos amino de cadeia lateral de lisina do referido anticorpo. Em tais modalidades, o anticorpo é pré-derivatizado com um grupo reativo a tiol tal como uma maleimida, vinilsulfona, bromoacetamida ou iodoacetamida por procedimentos bem descritos na técnica.

[0070] No contexto do presente trabalho, um processo foi surpreendentemente descoberto pelo qual os ligadores de medicamento CPT podem ser preparados onde a CPT possui adicionalmente um grupo 10-hidroxil. Este processo envolve, porém não é limitado a, proteção do grupo 10-hidroxil group como um derivativo det-butiloxicarbonil (BOC), seguido pela preparação do penúltimo intermediário do conjugado medicamento-ligador. Geralmente, a remoção do grupo BOC requer tratamento com ácido forte tal como ácido

trifluoroacético (TFA). Sob estas condições, o carbonato CPT 20-O-ligador, contendo grupos protetores a serem removidos também está susceptível a clivagem, com isso, dando origem a CPT intactos. De fato, o argumento para uso de um grupo potetor de metoxitritil (MMT) para a cadeia lateral de lisina da molécula do ligador foi precisamente para evitar esta possibilidade, conforme enunciado na técnica, (Walker *et al.*, 2002). Descobriu-se que a remoção seletiva do grupo protetor BOC fenólico é possível por realizar reações de duração curta, da melhor forma de 3 a 5 minutos. Sob estas condições, o produto predominante foi aquele no qual o 'BOC' na posição 10-hidroxil foi removido, enquanto o carbonato na posição '20' estava intacto.

[0071] Uma abordagem alternativa envolve proteger a posição 10-hidroxi do análogo da CPT com um grupo, exceto 'BOC', de forma que o produto final esteja pronto para conjugação com anticorpos sem uma necessidade para desproteger o grupo protetor 10-OH. O grupo protetor 10-hidroxi que converte o 10-OH em um carbonato fenólico ou um éster fenólico é prontamente desprotegido por condições de pH fisiológico ou por esterases após administração *in vivo* do conjugado. A remoção mais rápida de um carbonato fenólico na posição 10 vs. um carbonato terciário na posição 20 de 10-hidroxicamptotecina sob condição fisiológica foi descrito por He *et al.* (He *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 4003-4008 (2004)). Um grupo protetor 10-hidroxi em SN-38 pode ser 'COR' onde R pode ser um alquil tal como "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-" onde n is 1-10 e onde o grupo amina terminal está opcionalmente na forma de um sal quaternário para solubilidade aquosa aumentada ou um resíduo de alquil simples tal como "CH₃-(CH₂)_n-" onde n é 0-10, ou este pode ser uma fração alcóxi tal como "CH₃-(CH₂)_n-O-" onde n é 0-10, ou "N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O-" onde n é 2-10, ou "R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-" onde R₁ é etil ou metil e n é um número inteiro com valores de 0-10. Estes

derivativos de 10-hidroxi são prontamente preparados por tratamento com cloroformato do reagente escolhido, caso o derivativo final for um carbonato. Tipicamente, a camptotecina contendo 10-hidroxi tal como SN-38 é tratada com um equivalente molar de cloroformato em dimetilformamida usando trietilamina como a base. Sob estas condições, a posição 20-OH permanece intacta. Para formar 10-O-esteres, cloreto ácido do regente escolhido é usado.

[0072] Em um processo preferencial da preparação de um conjugado de um derivativo do medicamento e um anticorpo da fórmula geral 2, onde os descritores L2, L1, AA e A-X são conforme descritos nas seções anteriores, a fração do medicamento bifuncional, [L2]-[L1]-[AA]_m-[A-X]-Medicamento é preparada primeiro, seguida pela conjugação da fração do medicamento bifuncional para o anticorpo (indicado aqui como "MAb").

[0073] Em um processo preferencial de preparação de um conjugado de um derivativo do medicamento e um anticorpo da fórmula geral 2, onde os descritores L2, L1, AA e A-OH estão descritos nas seções anteriores, a fração do medicamento bifuncional é preparada por primeiro ligar A-OH ao C-terminal de AA através de uma ligação de amida, seguida por acoplamento do terminal amina de AA a um grupo de ácido carboxílico de L1. Se AA estiver ausente (por exemplo m= 0), A-OH é diretamente ligado a L1 através de uma ligação de amida. O ligador transversal [L1]-[AA]_m-[A-OH], é ligado ao grupo hidroxil ou amina do medicamento e este é seguido pela ligação com a fração L1 por tirar recurso para a reação entre grupos de azida (ou acetileno) e acetileno (ou azida) em L1 e L2 através de química click.

[0074] Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo monoclonal (MAb). Em outras modalidades, o anticorpo pode ser um MAb multivalente e/ou multiespecífico. O anticorpo pode ser um anticorpo murino, quimérico, humanizado ou monoclonal humano, e o referido anticorpo pode ser uma

forma intacta, fragmento (Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂), ou sub-fragmento (construtos de cadeia única), ou de um isótopo de IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA ou submoléculas a partir deste ponto.

[0075] Em uma modalidade preferencial, o anticorpo se liga a um antígeno ou epítopo de um antígeno expresso em uma célula cancerígena ou maligna. A célula cancerígena é preferencialmente uma célula de um tumor hematopoiético, carcinoma, sarcoma, melanoma ou um tumor glial. Uma malignidade preferencial a ser tratada de acordo com a presente invenção é um tumor sólido maligno ou neoplasma hematopoietico.

[0076] Em uma modalidade preferencial, a fração clivável intracelularmente pode ser clivada após ser internalizada na célula após ligação pelo conjugado MAb-medicamente a um receptor deste e, especialmente, clivada por esterases e peptidases.

Técnicas Gerais de Anticorpos

[0077] As técnicas para preparação de anticorpos monoclonais em relação a quase qualquer antígeno alvo são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Köhler e Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), e Coligan *et al.* (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Resumidamente, anticorpos monoclonais podem ser obtidos por injetar camundongos com uma composição compreendendo um antígeno, remover o baço para obter linfócitos B, fundir os linfócitos B com células do mieloma para produzir hibridomas, clonar os hibridomas, selecionar clones positivos que produzem anticorpos para o antígeno, cultivar os clones que produzem anticorpos para o antígeno e isolar os anticorpos das culturas de hibridoma.

[0078] As MAbs podem ser isoladas e purificadas das culturas de hibridoma por uma variedade de técnicas bem estabelecidas. Tais técnicas de

isolamento incluem cromatografia de afinidade com Sefarose de Proteína-A ou Proteína-G, cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia por troca iônica. Veja, por exemplo, Coligan nas páginas 2.7.1-2.7.12 e páginas 2.9.1-2.9.3. Também, vide Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," em *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

[0079] Após o cultivo inicial de anticorpos para o imunógeno, os anticorpos podem ser sequenciados e subsequentemente preparados por técnicas recombinantes. A humanização e quimerização de anticorpos murinos e fragmentos de anticorpos são bem conhecidas para os versados na técnica, conforme discutido abaixo.

[0080] O versado na técnica perceberá que os métodos e composições reivindicados podem utilizar uma ampla variedade de anticorpos conhecidos na técnica. Os anticorpos de uso podem ser comercialmente obtidos de uma ampla variedade de fontes conhecidas. Por exemplo, uma variedade de linhas de hibridomas que secretam anticorpos está disponível pela American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Um grande número de anticorpos em relação a vários alvos de doença, incluindo, porém não limitado, a antígenos associados a tumores, foram depositados na ATCC e/ou publicaram sequências variáveis de região e estão disponíveis para uso nos métodos e composições reivindicados. Vide por exemplo, as Patentes U.S. N°s 7.312.318; 7.282.567; 7.151.164; 7.074.403; 7.060.802; 7.056.509; 7.049.060; 7.045.132; 7.041.803; 7.041.802; 7.041.293; 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812;

6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.155; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 6.455.044; 6.455.040. 6.451.310; 6.444.206' 6.441.143; 6.432.404; 6.432.402; 6.419.928; 6.413.726; 6.406.694; 6.403.770; 6.403.091; 6.395.276; 6.395.274; 6.387.350; 6.383.759; 6.383.484; 6.376.654; 6.372.215; 6.359.126; 6.355.481; 6.355.444; 6.355.245; 6.355.244; 6.346.246; 6.344.198; 6.340.571; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953, 5.525.338; a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por referência. Estes são apenas exemplificativos e uma ampla variedade de outros anticorpos e seus hibridomas é conhecida na técnica. O versado na técnica perceberá que as sequências de anticorpos ou hibridomas que secretam anticorpos em relação a quase qualquer antígeno associado a doença pode ser obtido por uma pesquisa simples na base de dados da ATCC, NCBI e/ou USPTO por anticorpos contra um alvo associado a doença escolhida de interesse. Os domínios de ligação com antígenos dos anticorpos clonados podem ser amplificados, extirpados, ligado a um vetor de expressão, transfetados em uma célula hospedeira adaptada e usada para produção de proteínas, utilizando técnicas padronizadas bem

conhecidas na técnica. Anticorpos isolados podem ser conjugados a agentes terapêuticos, tais como camptotecinas, usando as técnicas divulgadas neste documento.

Anticorpos Químéricos e Humanizados

[0081] Um anticorpo químérico é uma proteína recombinante na qual as regiões variáveis de um anticorpo humano foram substituídas por regiões variáveis de, por exemplo, um anticorpo de camundongo, incluindo as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo de camundongo. Os anticorpos químéricos exibem imunogenicidade reduzida e estabilidade aumentada quando administrados a um sujeito. Os métodos para construção de anticorpos químéricos são bem conhecidos na técnica (por exemplo, Leung et al., 1994, *Hybridoma* 13:469).

[0082] Um anticorpo monoclonal químérico pode ser humanizado por transferir os CDRs de camundongo pelas cadeias variáveis pesadas e leves da imunoglobulina de camundongo para os domínios variáveis correspondentes de um anticorpo humano. As regiões de estrutura (FR) de camundongos no anticorpo monoclonal químérico também são substituídas por sequências de FR humanas. Para preservar a estabilidade e especificidade do antígeno do monoclonal humanizado, um ou mais resíduos de FR humano podem ser substituídos pelos resíduos de equivalentes de camundongos. Anticorpos monoclonais humanizados podem ser usados para tratamento terapêutico de sujeitos. As técnicas para produção de anticorpos monoclonais humanizados são bem conhecidas na arte. (Vide, por exemplo, Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534; Carter et al., 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immun.*, 1993, 150:2844.)

[0083] Outras modalidades podem ser relativas a anticorpos de primatas não humanos. Técnicas gerais para gerar anticorpos úteis de forma terapêutica em babuínos podem ser encontradas, por exemplo, em Goldenberg al., WO 91/11465 (1991), e em Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990). Em outra modalidade, um anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos podem ser obtidos de camundongos transgênicos que foram manipulados para produzir anticorpos humanos específicos em resposta a desafio antigênico, conforme discutido abaixo.

Anticorpos Humanos

[0084] Métodos para produção de anticorpos completamente humanos usando abordagens combinatórias ou animais transgênicos transformados com locais de imunoglobulinas humanas são conhecidos na técnica (*por exemplo*, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad e Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke e Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50, cada um incorporado neste documento por referência). Espera-se que tais anticorpos completamente humanos exibam ainda menos efeitos colaterais do que os anticorpos quiméricos ou humanizados e que funcionem *in vivo* como anticorpos humanos essencialmente endógenos. Em determinadas modalidades, os métodos e procedimentos reivindicados podem utilizar anticorpos humanos produzidos por tais técnicas.

[0085] Em uma alternativa, a técnica de *phage display* pode ser usada para gerar anticorpos humanos (*e.g.*, Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40, incorporada neste documento por referência). Anticorpos humanos podem ser gerados a partir de humanos normais ou de humanos que exibem um estado de uma doença em especial, tal como câncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). A vantagem de construir anticorpos humanos a partir de

um indivíduo doente é que o repertório do anticorpo em circulação pode ser influenciado em relação a anticorpos contra antígenos associados à doença.

[0086] Em exemplo não limitante desta metodologia, Dantas-Barbosa et al. (2005) construiu uma biblioteca de *phage display* de fragmentos de anticorpos Fab humanos a partir de pacientes com osteosarcoma. Geralmente, o RNA total foi obtido a partir de linfócitos da corrente sanguínea (*Id.*). O Fab recombinante foi克隆ado a partir de repertório de anticorpos de cadeia μ , γ e κ e inseridos em uma biblioteca de *phage display* (*Id.*) Os RNAs foram convertidos em cDNAs e usados para criar bibliotecas de cDNA de Fab usando iniciadores específicos contra as sequências de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97, incorporado neste documento para referência). A construção da biblioteca foi realizada de acordo com Andris-Widhopf et al. (2000, In: *Phage display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 to 9.22, incorporado neste documento por referência). Os fragmentos de Fab foram digeridos com endonucleases de restrição e inseridos no genoma do bacteriófago para criar a biblioteca de *phage display*. Tais bibliotecas podem ser triadas por métodos padronizados de *phage display*. O versado na técnica perceberá que esta técnica é apenas exemplificativa e qualquer método conhecido para criar ou triar anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpos por *phage display* podem ser usados.

[0087] Em outra alternativa, animais transgênicos que foram manipulados geneticamente para produzir anticorpos humanos podem ser usados para gerar anticorpos contra essencialmente qualquer alvo imunogênico, usando protocolos de imunização padronizados conforme discutidos acima. Os métodos para obtenção de anticorpos humanos a partir de camundongos transgênicos são descritos por Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg

et al., *Nature* 368:856 (1994), e Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). Um exemplo não limitador do referido sistema é o XENOMOUSE® (*por exemplo*, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, incorporado neste documento por referência) de Abgenix (Fremont, CA). No XENOMOUSE® e animais semelhantes, os genes de anticorpo de camundongo foram inativados e substituídos por genes de anticorpos humanos funcionais, enquanto que o restante do sistema imune do camundongo permanece intacto.

[0088] O XENOMOUSE® foi transformado com YACs configurados com linha germinativa (cromossomos artificiais de levedura) que continham porções de IgH humano e loci de Ig kappa, incluindo a maioria das sequências de regiões variáveis, juntamente com genes acessórios e sequências reguladoras. O repertório de regiões variáveis humanas pode ser usado para gerar células B produtoras de anticorpos que podem ser processados em hibridomas por técnicas conhecidas. Um XENOMOUSE® imunizado com um antígeno algo produzirá anticorpos humanos pela resposta imune normal que pode ser cultivado e/ou produzido por técnicas padronizadas discutidas acima. Uma variedade de cepas de XENOMOUSE® está disponível, cada uma sendo capaz de produzir uma classe diferente de anticorpos. Anticorpos humanos produzidos transgenicamente tem demonstrado possuir potencial terapêutico, enquanto que mantém as propriedades farmacocinéticas de anticorpos humanos normais (Green et al., 1999). O versado na técnica perceberá que as composições e métodos reivindicados não estão limitados ao uso do sistema de XENOMOUSE®, porém, podem usar qualquer animal transgênico que foi manipulado geneticamente para produzir anticorpos humanos.

Produção de Fragmentos de Anticorpos

[0089] Algumas modalidades de métodos e/ou composições reivindicadas podem dizer respeito aos fragmentos de anticorpos. Tais fragmentos de

anticorpos podem ser obtidos, por exemplo, por digestão de pepsina ou papaína de anticorpos completos por métodos convencionais. Por exemplo, fragmentos de anticorpos podem ser produzidos por clivagem enzimática de anticorpos com pepsina para fornecer um fragmento 5S denotado $F(ab')_2$. Este fragmento pode ser posteriormente clivado usando um agente redutor de tiol e, opcionalmente, um grupo bloqueador para grupos de sulfidril resultantes da clivagem de ligações de dissulfetos, para produzir fragmentos monovalentes de 3.5S Fab. Alternativamente, uma clivagem enzimática usando pepsina produz dois fragmentos de Fab monovalente e um fragmento de Fc. Métodos exemplificativos para produzir fragmentos de anticorpos estão divulgados na Pat. U.S. Nº 4,036,945; Pat. U.S. Nº 4,331,647; Nisonoff et al., 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89:230; Porter, 1959, Biochem. J., 73:119; Edelman et al., 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, página 422 (Academic Press), e Coligan et al. (eds.), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley & Sons).

[0090] Outros métodos de clivagem de anticorpos, tais como separação de cadeias pesadas para formar fragmentos de cadeia leve-pesada monovalentes, clivagem adicional de fragmentos ou outras técnicas enzimáticas, químicas ou genéticas também podem ser usadas, desde que os fragmentos se liguem aos抗ígenos que é reconhecido por anticorpo intacto. Por exemplo, fragmentos de Fv compreendem uma associação de cadeias de V_H e V_L . Esta associação pode ser não covalente, conforme descrito em Inbar et al., 1972, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 69:2659. Alternativamente, as cadeias variáveis podem ser ligadas por uma ligação de dissulfeto intermolecular ou ligadas transversalmente por elementos químicos, tais como glutaraldeído. See Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

[0091] Preferencialmente, os fragmentos de Fv compreendem cadeias de V_H e V_L ligadas por um ligador de peptídeo. Estas proteínas de ligação com

antígeno de cadeia única (scFv) são preparadas pela construção de um gene estrutural compreendendo sequências de DNA que codificam os domínios de V_H e V_L , ligados por uma sequência de ligador de oligonucleotídeos. O gene estrutural é inserido em um vetor de expressão que é subsequencialmente introduzido em uma célula hospedeira, tal como *E. coli*. As células hospedeiras recombinantes sintetizam uma cadeia de polipeptídeos única com um peptídeo ligador interligando os dois domínios V. Os métodos para produção de scFvs são bem conhecidos na técnica. Veja Whitlow et al., 1991, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97; Bird et al., 1988, *Science*, 242:423; U.S. Pat. No. 4,946,778; Pack et al., 1993, *Bio/Technology*, 11:1271, e Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437.

[0092] Outra forma de um fragmento de anticorpo é um anticorpo de domínio único (dAb), às vezes mencionado como um anticorpo de cadeia única. As técnicas para produção de anticorpos de domínio único são bem conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Cossins et al., *Protein Expression e Purification*, 2007, 51:253-59; Shuntao et al., *Molec Immunol* 2006, 43:1912-19; Tanha et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276:24774-780). Outros tipos de fragmentos de anticorpo podem compreender uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Peptídeos de CDR ("unidades mínimas de reconhecimento") podem ser obtidos por construir genes que codificam o CDR de um anticorpo de interesse. Tais genes são preparados, por exemplo, pelo uso da reação de cadeia de polimerase para sintetizar a região variável de RNA de células produtoras de anticorpos. See Larrick et al., 1991, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106; Ritter et al. (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING e CLINICAL APPLICATION, páginas 166-179 (Cambridge University Press); Birch et al., (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES e APPLICATIONS, páginas 137-

185 (Wiley-Liss, Inc.)

Variações de Anticorpos

[0093] Em determinadas modalidades, as sequências de anticorpos, tais como porções de anticorpos Fc, podem ser variadas para otimizar as características fisiológicas dos conjugados, tal como a meia-vida no soro. Métodos para substituição de sequências de aminoácidos nas proteínas são amplamente conhecidos na técnica, tais como por mutagênese direcionada ao local (por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd Ed, 1989). Em modalidades preferenciais, a variação pode envolver a adição ou remoção de um ou mais sítios de glicosilação na sequência de Fc (por exemplo, Patente U.S. N° 6.254.868, a seção de Exemplos que é incorporada no presente documento por referência). Em outras modalidades preferenciais, substituições de aminoácidos específicos na sequência Fc podem ser realizadas (por exemplo, Hornick et al., 2000, *J Nucl Med* 41:355-62; Hinton et al., 2006, *J Immunol* 176:346-56; Petkova et al. 2006, *Int Immunol* 18:1759-69; Patente U.S. N° 7.217.797; cada uma incorporada no presente documento por referência).

Antígenos Alvo e Anticorpos Exemplificativos

[0094] Em uma modalidade preferencial, anticorpos são usados que reconhecem e/ou ligam com抗ígenos que são expressos em altos níveis em células-alvo e que são expressos predominantemente ou exclusivamente em células doentes versus tecidos normais. Mais preferencialmente, os anticorpos internalizam rapidamente após a ligação. Um anticorpo exemplificativo de rápida internalização é o anticorpo LL1 (anti-CD74), com uma taxa de internalização de aproximadamente 8×10^6 moléculas do anticorpo por célula por dia (e.g., Hansen et al., 1996, *Biochem J.* 320:293-300). Sendo assim, um anticorpo de "rápida internalização" pode ser um com taxa de internalização de

cerca de 1×10^6 a cerca de 1×10^7 moléculas de anticorpo por célula por dia. Anticorpos de uso nas composições e métodos reivindicados podem incluir MAbs com propriedades conforme recitadas acima. Anticorpos exemplificativos de uso para terapia de câncer, por exemplo, incluem, porém não se limitam a, LL1 (anti-CD74), LL2 ou RFB4 (anti-CD22), veltuzumabe (hA20, anti-CD20), rituxumabe (anti-CD20), obinutuzumabe (GA101, anti-CD20), lambrolizumabe (receptor anti-PD-1), nivolumabe (receptor anti-PD-1), ipilimumabe (anti-CTLA-4), RS7 (glicoproteína antiepitelial-1 (EGP-1, também conhecida como TROP-2)), PAM4 ou KC4 (ambas anti-mucina), MN-14 (anti-antígeno carcinoembrionário (CEA, também conhecido como CD66e ou CEACAM5), MN-15 ou MN-3 (anti-CEACAM6), Mu-9 (antigen-p anti-côlon específico), Immu 31 (uma anti-alfa-fetoproteína), R1 (anti-IGF-1R), A19 (anti-CD19), TAG-72 (por exemplo, CC49), Tn, J591 ou HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata)), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA dimer), D2/B (anti-PSMA), G250 (uma anti-anidrase carbônica IX MAb), L243 (anti-HLA-DR) alemtuzumabe (anti-CD52), bevacizumabe (anti-VEGF), cetuximabe (anti-EGFR), gemtuzumabe (anti-CD33), ibritumomabe tiuxetana (anti-CD20); panitumumabe (anti-EGFR); tositumomabe (anti-CD20); PAM4 (aka clivatuzumabe, anti-mucina) e trastuzumabe (anti-ErbB2). Tais anticorpos são conhecidos na técnica (por exemplo, Patente U.S. N° 5,686,072; 5,874,540; 6,107,090; 6,183,744; 6,306,393; 6,653,104; 6,730,300; 6,899,864; 6,926,893; 6,962,702; 7,074,403; 7,230,084; 7,238,785; 7,238,786; 7,256,004; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,585,491; 7,612,180; 7,642,239; e Pedido de Patente U.S. Publ. N° 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001; a seção de Exemplos de cada um incorporada neste documento por referência.) Anticorpos específicos de uso incluem hPAM4 (Patente U.S. N° 7.282.567), hA20 (Patente U.S. N° 7.251.164), hA19 (Patente U.S. N° 7.109.304), hIMMU-31

(Patente U.S. N° 7.300.655), hLL1 (Patente U.S. N° 7.312.318,), hLL2 (Patente U.S. N° 7.074.403), hMu-9 (Patente U.S. N° 7.387.773), hL243 (Patente U.S. N° 7.612.180), hMN-14 (Patente U.S. N° 6.676.924), hMN-15 (Patente U.S. N° 7.541.440), hR1 (Pedido de Patente U.S. Nº 12/772,645), hRS7 (Patente U.S. N° 7.238.785), hMN-3 (Patente U.S. Nº 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (Pedido de Patente U.S. 11/983,372, depositado como ATCC PTA-4405 e PTA-4406) e D2/B (WO 2009/130575) para o texto de cada patente ou pedido citado é incorporado no presente documento por referência com respeito às seções de Figuras e Exemplos.

[0095] Outros抗ígenos úteis que podem ser direcionados usando os conjugados descritos incluem anidrase carbônica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/neu, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (e.g., C2B8, hA20, 1F5 MAbs), CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM6, CTLA-4, alpha-fetoprotein (AFP), VEGF (e.g., AVASTIN®, variante de splice de fibronectina), fibronectina de ED-B (por exemplo, L19), EGP-1 (TROP-2), EGP-2 (por exemplo, 17-1A), receptor EGF (ErbB1) (por exemplo, ERBITUX®), ErbB2, ErbB3, Fator H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GRO-β, HMGB-1, fator induzível por hipóxia (HIF), HM1.24, HER-2/neu, fator de crescimento semelhante a insulina (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IFN-λ, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, gangliosídeos, HCG, o antígeno HLA-DR para o qual L243 se liga, antígenos CD66, por exemplo, CD66a-d ou uma combinação destes, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, fator de crescimento placentário (PIGF), PSA

(antígeno específico de próstata), PSMA, antígeno PAM4, receptor PD-1, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos Thomas-Friedenreich, antígenos de necrose tumoral, antígeno de angiogênese tumoral, TNF- α , receptor TRAIL (R1 e R2), TROP-2, VEGFR, RANTES, T101, antígenos de células-tronco de câncer, fatores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, e um produto de oncogene.

[0096] Uma análise abrangente de alvos adequados de antígenos (Designação do Cluster, ou CD) em células malignas hematopoiéticas, como mostrado por citometria de fluxo e que podem ser um guia para selecionar anticorpos adequados para imunoterapia conjugada com medicamento é encontrada em Craig e Foon, *Blood* pré-publicada em 15 de janeiro de 2008; DOI 10.1182/blood-2007-11-120535.

[0097] Os antígenos CD66 consistem de cinco glicoproteínas diferentes com estruturas similares, CD66a-e, codificadas pelos membros da família de genes de antígeno carcinoembrionário (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 e CEA, respectivamente. Estes antígenos CD66 (por exemplo, CEACAM6) são expressos principalmente em granulócitos, células epiteliais normais do trato digestivo e células tumorais de vários tecidos. Antígenos de câncer de testículos, tais como NY-ESO-1 também são incluídos como alvos adequados para câncer (Theurillat et al., *Int. J. Cancer* 2007; 120(11):2411-7), bem como CD79a em leucemia mielóide (Kozlov et al., *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005; 163(1):62-7) e também doenças de célula B e CD79b para linfoma não Hodgkin (Poison et al., *Blood* 110(2):616-623). Inúmeros antígenos supracitados estão divulgados no Pedido Provisório U.S. Nº de série 60/426.379, intitulado "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics," (Uso de Complexos Multiespecíficos, Não covalentes para Administração Direcionada de Agentes Terapêuticos", depositado em 15 de novembro de 2002. Células-tronco de

câncer que estão mencionadas como sendo populações de células malignas precursoras mais resistentes a terapia (Hill e Perris, *J. Natl. Cancer Inst.* 2007; 99:1435-40), possuem抗ígenos que podem ser direcionados em determinados tipos de câncer, tais como CD133 no câncer de próstata (Maitland et al., *Ernst Schering Found. Sympos. Proc.* 2006; 5:155-79), câncer de pulmão de células não pequenas (Donnenberg et al., *J. Control Release* 2007; 122(3):385-91), e glioblastoma (Beier et al., *Cancer Res.* 2007; 67(9):4010-5), e CD44 em câncer colorretal (Dalerba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104(24):10158-63), câncer pancreático (Li et al., *Cancer Res.* 2007; 67(3):1030-7), e no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Prince et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104(3):973-8).

[0098] Para terapia de mieloma múltiplo, anticorpos adequados de direcionamento foram descritos contra, por exemplo, CD38 e CD138 (Stevenson, *Mol Med* 2006; 12(11-12):345-346; Tassone et al., *Blood* 2004; 104(12):3688-96), CD74 (Stein et al., *ibid.*), CS1 (Tai et al., *Blood* 2008; 112(4):1329-37, e CD40 (Tai et al., 2005; *Cancer Res.* 65(13):5898-5906).

[0099] O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é um importante regulador de imunidade inata e adaptativa e apoptose. Foi relatado que CD74 é o receptor endógeno para MIF (Leng et al., 2003, *J Exp Med* 197:1467-76). O efeito terapêutico de anticorpos anti-CD74 antagonísticos em caminhos intracelulares mediados por MIF podem ser de uso para tratamento de uma ampla gama de estados de doenças, tais como câncer de bexiga, próstata, mamas, pulmão, cólon e leucemia linfocítica crônica (por exemplo, Meyer-Siegler et al., 2004, *BMC Cancer* 12:34; Shachar & Haran, 2011, *Leuk Lymphoma* 52:1446-54); doenças autoimunes tais como atrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (Morand & Leech, 2005, *Front Biosci* 10:12-22; Shachar & Haran, 2011, *Leuk Lymphoma* 52:1446-54); doenças dos rins como

rejeição de aloenxerto renal (Lan, 2008, *Nephron Exp Nephrol.* 109:e79-83); e inúmeras doenças inflamatórias (Meyer-Siegler et al., 2009, *Mediators Inflamm* epub March 22, 2009; Takahashi et al., 2009, *Respir Res* 10:33; Milatuzumabe (hLL1) é um anticorpo anti-CD74 exemplificativo de uso terapêutico para tratamento de doenças mediadas por MIF.

[00100] Anticorpos Anti-TNF- α são conhecidos na técnica e podem ser de uso para tratar doenças imunes, tais como doença autoimune, disfunção imune (por exemplo, doença enxerto contra hospedeiro, rejeição de transplante de órgãos) ou diabetes. Anticorpos conhecidos contra TNF- α incluem o anticorpo humano CDP571 (Ofei et al., 2011, *Diabetes* 45:881-85); anticorpos murinos MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B e M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL); infliximabe (Centocor, Malvern, PA); certolizumabe pegol (UCB, Brussels, Belgium); e adalimumabe (Abbott, Abbott Park, IL). Estes e muitos outros anticorpos anti-TNF- α conhecidos podem ser usados nos métodos e composições reivindicados. Outros anticorpos de uso para terapia de doença desreguladora imune ou doença autoimune incluem, porém não se limitam a, anticorpos anti-células B tais como veltuzumabe, epratuzumabe, milatuzumabe ou hL243; tocilizumabe (receptor anti-IL-6); basiliximabe (anti-CD25); daclizumabe (anti-CD25); efalizumabe (anti-CD11a); muromonabe-CD3 (receptor anti-CD3); anti-CD40L (UCB, Bruxelas, Bélgica); natalizumabe (integrina anti- α 4) e omalizumabe (anti-IgE).

[00101] Diabetes tipo 1 e tipo 2 podem ser tratadas usando anticorpos conhecidos contra抗ígenos de células B, tais como CD22 (epratuzumabe e hRFB4), CD74 (milatuzumabe), CD19 (hA19), CD20 (veltuzumabe) ou HLA-DR (hL243) (*vide, por exemplo*, Winer et al., 2011, *Nature Med* 17:610-18). Anticorpos Anti-CD3 antibodies também foram propostos para terapia de diabetes tipo 1 (Cernea et al., 2010, *Diabetes Metab*

Rev 26:602-05).

[00102] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada para tratar um sujeito com uma doença metabólica, tal como amiloidose ou uma doença neurodegenerativa, tal como doença de Alzheimer. Bapineuzumabe está sob testes clínicos para terapia de doença de Alzheimer. Outros anticorpos propostos para terapia de doenças de Alzheimer incluem Alz 50 (Ksiezak-Reding et al., 1987, *J Biol Chem* 263:7943-47), gantenerumabe, e solanezumabe. Infliximabe, um anticorpo anti-TNF- α , é citado como capaz de reduzir placas amilóides e melhorar a cognição.

[00103] Em uma modalidade preferencial, doenças que podem ter sido tratadas usando composições e métodos reivindicados incluem doenças cardiovasculares, tais como coágulos de fibrina, arterioesclerose, isquemia do miocárdio e infarto. Anticorpos para fibrina (por exemplo, scFv(59D8); T2G1s; MH1) são conhecidos e nos testes clínicos como agentes de processamento de imagens para divulgar os referidos coágulos e anticorpos MN-3, MN-15, anti-NCA95, e anti-CD15 podem direcionar infartos do miocárdio e isquemia do miocárdio. (Vide, por exemplo, Patente U.S. N° 5.487.892; 5.632.968; 6.294.173; 7.541.440, a seção de Exemplos de cada uma está incorporada neste documento por referência) Anti-macrófago, anti-lipoproteína de baixa densidade (LDL), anti-MIF, e anti-CD74 (por exemplo, hLL1) anticorpos podem ser usados para direcionar placas de arterioesclerose. Abciximabe (anti-glicoproteína IIb/IIIa) foi aprovada para uso suplementar para para prevenção de reestenose em intervenções coronárias percutâneas e no tratamento de angina instável (Waldmann et al., 2000, *Hematol* 1:394-408). Anticorpos Anti-CD3 tem sido citados como capazes de reduzir o desenvolvimento e progressão de arterioesclerose (Steffens et al., 2006, *Circulation* 114:1977-84). Anticorpos contra LDL oxidata induziram a regressão de arterioesclerose estabelecida em

um modelo de camundongo (Ginsberg, 2007, *J Am Coll Cardiol* 52:2319-21). Anticorpos Anti-ICAM-1 tem demonstrado ser capazes de reduzir o dano celular isquêmico após oclusão de artéria cerebral em ratos (Zhang et al., 1994, *Neurology* 44:1747-51). Anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente para antígenos de leucócitos são representados por: Anticorpos monoclonais anti-célula T OKT (disponibilizados pela empresa Ortho Pharmaceutical) que se ligam a linfócitos T normais; os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas tendo os números de adesão ATCC HB44, HB55, HB12, HB78 e HB2; G7E11, W8E7, NKP15 e GO22 (Becton Dickinson); NEN9.4 (New England Nuclear); e FMCl1 (Sera Labs). Uma descrição dos anticorpos contra antígenos de fibrina e plaquetas encontra-se em Knight, *Semin. Nucl. Med.*, 20:52-67 (1990).

[00104] Em uma outra modalidade preferencial, anticorpos são usados para internalizar de forma rápida e, então, são re-expressos, processados e apresentados em superfícies celulares, permitindo o absorção e aglutinação contínuas de conjugados circulantes pela célula. Um exemplo de um par anticorpo/antígeno mais preferencial é LL1, um MAb anti-CD74 (cadeia invariante, chaperona específica de classe II, II) (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 6.653.104; 7.312.318; a seção de Exemplos de cada uma está incorporada aqui por referência). O antígeno CD74 é altamente expresso em linfomas de células B (incluindo mielomas múltiplos) e leucemias, determinados linfomas de células T, melanomas, câncer colônico, de pulmão e renal, glioblastomas e outros tipos determinados de câncer (Ong et al., *Immunology* 98:296-302 (1999)). A revisão o uso de anticorpos CD74 em câncer está descrita em Stein et al., *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5556s-5563s, incorporado no presente documento por referência.

[00105] As doenças que são preferencialmente tratadas com

anticorpos anti-CD74 incluem, porém não se limitam a, linfoma não-Hodgkin, doença de Hodgkin, melanoma, câncer de pulmão, renal e colônico, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mielóides e mieloma múltiplo. A expressão contínua do antígeno CD74 por curtos períodos de tempo na superfície das células-alvo, seguida por internalização do antígeno e re-expressão do antígeno, permite que o anticorpo de direcionamento LL1 seja internalizado juntamente com frações quimioterápicas que ele transporta. Isto permite uma concentração alta e terapêutica do conjugado do medicamento quimioterápico LL1 a ser acumulado dentro de tais células. Conjugados de medicamentos quimioterápicos LL1 internalizados são ciclados através de lisossomos e endossomos e a fração quimioterápica é liberada em uma forma ativa dentro das células-alvo.

[00106] Em uma outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos podem ser usados contra patógenos, desde que os anticorpos contra os patógenos sejam conhecidos. Por exemplo, anticorpos e fragmentos de anticorpos que ligam de forma específica marcadores produzidos ou associados com lesões infecciosas, incluindo infecções virias, bacterianas, por fungos e parasitárias, por exemplo, causadas por patógenos tais como bactérias, rickettsia, micoplasmas, protozoários, fungos e vírus, e antígenos e produtos associados dos quais os microorganismos foram divulgados, *interalia*, em Hansen et al., Pat. U.S. Nº 3.927.193 e Goldenberg U.S. Pat. N°s. 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.818.709 e 4.624.846; a seção de Exemplos de cada uma é incorporada neste documento por referência, e em Reichert e Dewitz, citado acima. Uma revisão alistando os anticorpos contra organismos infecciosos (antitoxina e anticorpos antiviriais), bem como outros alvos, pode se encontrada em Casadevall, *Clin Immunol* 1999; 93(1):5-15, incorporada no presente documento por referência.

[00107] Em uma modalidade preferencial, os patógenos são selecionados de grupos consistindo de vírus HIV, *Mycobacterium de tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilys influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas da doença de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, vírus da raiva, vírus influenza, citomegalovírus, vírus da herpes simples tipo I, vírus da herpes simples tipo II, parvovírus de soro humano, vírus sincicial respiratório, vírus da herpes zóster, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus do sarampo, adenovírus, vírus da leucemia em célula T humana, vírus Epstein-Barr, vírus da leucemia murina, vírus da caxumba, vírus da estomatite vesicular, vírus da sindbis, vírus da coriomeningite linfocítica, vírus da verruga, vírus da língua azul, vírus Sendai, vírus da leucemia felina, reovírus, poliovírus, vírus símio 40, vírus do tumor mamário do camundongo, vírus da dengue, vírus da rubéola, vírus do Nilo Ocidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Babesia bovis*, *Elmeria tenella*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania tropica*, *Trichinella spiralis*, *Theileria parva*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Mycoplasma arthritidis*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. salivarium* e *M. pneumoniae*, conforme divulgado na Patente U.S. N° 6.440.416; a seção de Exemplos de cada uma foi incorporada no presente documento por referência.

[00108] Em uma modalidade preferencial, os conjugados de medicamentos da presente invenção compreendendo anticorpos anti-gp120 e

outros anticorpos tais como anti-HIV podem ser usados como agentes terapêuticos para tratar HIV em pacientes com AIDS; e conjugados de medicamentos de anticorpos para *Mycobacterium tuberculosis* são adequados como agentes terapêuticos para tuberculose refratária por medicamento. Proteínas de fusão de MAb anti-gp120 (MAb anti HIV) e uma toxina, tal como exotocina de *Pseudomonas*, foram examinadas por propriedades antivirais (Van Oigen et al., *J Drug Target*, 5:75-91, 1998). As tentativas de tratar a infecção por HIV em pacientes com AIDS não foram bem sucedidas, possivelmente devido a eficácia insuficiente ou toxicidade inaceitável do hospedeiro. Os conjugados de medicamentos com CPT da presente invenção, de maneira vantajosa, não possuem tais efeitos colaterais tóxicos das toxinas protéicas e, portanto, são usados beneficamente no tratamento de infecção por HIV em pacientes com AIDS. Estes conjugados de medicamentos podem ser administrados sozinhos ou combinados com outros antibióticos ou agentes terapêuticos que são eficazes nos referidos pacientes quando administrados de maneira isolada. Possíveis anticorpos anti-HIV incluem o anticorpo anti-envelope P4/D10 descrito por Johansson et al. (*AIDS*. 2006 Oct 3;20(15):1911-5), bem como os anticorpos anti-HIV descritos e vendidos pela Polymun (Viena, Áustria), também descritos na Patente U.S. 5.831.034, Patente U.S. 5.911.989, e Vcelar et al., *AIDS* 2007; 21(16):2161-2170 e Joos et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(5):1773-9, todos incorporados no presente documento por referência. Um agente preferencial de direcionamento para HIV são várias combinações destes anticorpos a fim de suplantar a resistência.

[00109] Anticorpos de uso para tratar doenças autoimunes ou disfunções do sistema imune (por exemplo, doença enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante de órgãos) são conhecidos na técnica e podem ser conjugados a SN-38 usando os métodos e composições divulgados. Anticorpos

de uso para tratar doenças de disfunções autoimunes/imunes podem se ligar a抗ígenos exemplificativos, incluindo, porém não se limitando a, BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41a, CD43, CD45, CD55, TNF-alpha, interferon e HLA-DR. Anticorpos que se ligam a estes e outros抗ígenos alvo, discutidos acima, podem ser usados para tratar doenças de disfunção autoimune ou imune. Doenças autoimunes que podem ser tratadas com imunoconjungados podem incluir púrpura trombocitopênica idiopática aguda, púrpura trombocitopênica idiopática crônica, dermatomiosite, coreia de Sydenham, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, febre reumática, síndrome poliglandular, penfigóide bolhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, vasculites associadas a ANCA, doenças de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeite obliterante, síndrome de Sjogren, cirrose biliar primária, tiroidite de Hashimoto, tireotoxicose, esclerodermia, hepatite crônica ativa, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, penfigóide bolhoso, pênfigo vulgar, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arterite/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva, psoríase ou alveolite fribosante.

[00110] Os anticorpos discutidos acima e outros anticorpos conhecidos contra抗ígenos associados à doenças podem ser usados como conjugados de CPT, mais preferencialmente conjugados de SN-38, na prática dos métodos e composições reivindicados.

Anticorpos Biespecíficos e Multiespecíficos

[00111] Anticorpos biespecíficos são úteis em inúmeras aplicações biomédicas. Por exemplo, um anticorpo biespecífico com sítios de ligação para um antígeno de superfície de célula tumoral ou para um receptor de superfície de célula T pode direcionar a lise de células tumorais específicas por células T. Anticorpos biespecíficos que reconhecem gliomas e o epítopo CD3 em células T foram usados com sucesso no tratamento de tumores cerebrais em pacientes humanos (Nitta, et al. *Lancet*. 1990; 355:368-371). Um anticorpo biespecífico preferencial é um anticorpo anti-CD3 X anti-CD19. Em modalidades alternativas, um anticorpo anti-CD3 ou fragmento deste pode ser ligado a um anticorpo ou fragmento contra outro antígeno associado a célula B, tal como anti-CD3 X anti-CD20, anti-CD3 X anti-CD22, anti-CD3 X anti-HLA-DR ou anti-CD3 X anti-CD74. Em determinadas modalidades, as técnicas e composições para conjugação de agentes terapêuticos divulgadas neste documento podem ser usadas com anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos como frações de direcionamento.

[00112] Inúmeros métodos para produzir anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos são conhecidos, conforme divulgados, por exemplo, na Patente U.S. N° 7.405.320, a seção de Exemplos está incorporada no presente documento por referência. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos pelo método quadroma que envolve a fusão de dois hibridomas diferentes, cada um produzindo um anticorpo monoclonal que reconhece um sítio antigênico diferente (Milstein e Cuello, *Nature*, 1983; 305:537-540).

[00113] Outro método para produção de anticorpos biespecíficos usa ligadores transversais heterobifuncionais para atar quimicamente dois anticorpos monoclonais diferentes (Staerz, et al. *Nature*, 1985; 314:628-631; Perez, et al. *Nature*, 1985; 316:354-356). Anticorpos biespecíficos também

podem ser produzidos por redução de cada um dos dois anticorpos monoclonais parentais para as respectivas meia-moléculas que, portanto, são misturadas e reoxidadas para obter a estrutura híbrida (Staerz e Bevan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83:1453-1457). Uma alternativa envolve a reticulação química de dois ou três fragmentos de Fab' purificados separadamente usando ligadores adequados. (Ver, por exemplo, Pedido de Patente Europeu 0453082).

[00114] Outros métodos envolvem melhorar a eficiência de geração de hibridomas híbridos pela transferência de gene de marcadores selecionáveis distintos através de vetores de transporte derivados de retrovírus nos respectivos hibridomas parentais que são usados sequencialmente (DeMonte, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87:2941-2945); ou transfecção de uma linha celular de hibridoma com plasmídeos de expressão contendo os genes de cadeia pesada e leve de um anticorpo diferente.

[00115] Domínios V_H e V_L cognatos podem ser unidos com um ligador de peptídeo de composição e comprimento adequados (geralmente consistindo de mais de 12 resíduos de aminoácidos) para ormar uma Fv (scFv) de cadeia única com atividade de ligação. Os métodos para fabricação de scFvs estão divulgados na Pat. U.S. Nº 4.946.778 e Pat. U.S. Nº 5.132.405, a seção de Exemplos de cada uma está incorporada no presente documento por referência. A redução do comprimento do ligador de peptídeos para menos de 12 resíduos de aminoácidos evita o pareamento de domínios V_H e V_L na mesma cadeia e força o pareamento de domínios V_H e V_L com domínios complementares em outras cadeias, resultando na formação de multímeros funcionais. Cadeias polipeptídicas de domínios V_H e V_L que são unidas a ligadores entre 3 e 12 resíduos de aminoácidos forma predominantemente dímeros (chamados de diabodies). Com ligadores entre 0 e 2 resíduos de

aminoácidos, trímeros (chamados de triabody), e tetrâmeros (chamados de tetrabody) são favorecidos, porém, os padrões exatos de oligomerização parecem depender da composição bem como da orientação de V-domínios (V_H -ligador- V_L ou V_L -ligador- V_H), além do comprimento do ligador.

[00116] Estes técnicas para produção de anticorpos multiespecíficos ou biespecíficos exibem várias dificuldades em termos de rendimento baixo, necessidade de purificação, estabilidade baixa ou intensidade de trabalho da técnica. Mais recentemente, uma técnica conhecida como “*dock e lock*” (DNL) tem sido usada para produzir combinações de quase qualquer anticorpo desejado, fragmentos de anticorpos e outras moléculas efetoras (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143; 7.666.400; 7.858.070; 7.871.622; 7.906.121; 7.906.118; 8.163.291; 7.901.680; 7.981.398; 8.003.111 e 8.034.352; a seção de Exemplos de cada uma foi incorporada no presente documento por referência). A técnica utiliza domínios de ligação protéicos complementares, mencionados como domínios de ancoragem (AD) e domínios de dimerização e acoplamento (DDD) que se ligam uns aos outros e permitem a montagem de estruturas complexas, variando entre dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Estes formam complexos estáveis com alto rendimento sem a exigência de purificação extensiva. A técnica DNL permite a montagem de anticorpos monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Quaisquer das técnicas conhecidas na arte para criação de anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos podem ser usadas na prática ou métodos reivindicados no presente instrumento.

[00117] Em várias modalidades, um conjugado, conforme divulgado no presente documento, pode ser parte de um anticorpo composto, multiespecífico. Tais anticorpos podem conter dois ou mais sítios de ligação de antígenos diferentes com especificidades distintas. O composto multiespecífico

pode se ligar a diferentes epítopos do mesmo antígeno ou, alternativamente, pode se ligar a dois抗ígenos diferentes. Algumas das combinações de alvos preferenciais incluem as listadas na **Tabela 1**. Esta é uma lista de exemplos de combinações preferenciais, contudo, não tem o propósito de ser abrangente.

Tabela 1: Alguns exemplos de anticorpos multiespecíficos.

Primeiro Alvo	Segundo alvo
MIF	Uma segunda citocina efetora pró-inflamatória, especialmente HMGB-1, TNF- α , IL-1, ou IL-6
MIF	Quimiocina efetora pró-inflamatória, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
MIF	Receptor efetor pró-inflamatório, especialmente IL-6R, IL-13R, e IL-15R
MIF	Fator de coagulação, especialmente TF ou trombina
MIF	Fator de complemento, especialmente C3, C5, C3a, ou C5a
MIF	Proteína reguladora de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59, e mCRP
MIF	Antígeno ou receptor associado a câncer
HMGB-1	Uma segunda citocina efetora pró-inflamatória, especialmente MIF, TNF- α , IL-1, ou IL-6
HMGB-1	Quimiocina efetora pró-inflamatória, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
HMGB-1	Receptor efetor pró-inflamatório, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
HMGB-1	Fator de coagulação, especialmente TF ou trombina
HMGB-1	Fator de complemento, especialmente C3, C5, C3a, ou C5a
HMGB-1	Proteína reguladora de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59, e mCRP
HMGB-1	Antígeno ou receptor associado a câncer
TNF- α	Uma segunda citocina efetora pró-inflamatória, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1, ou IL-6
TNF- α	Quimiocina efetora pró-inflamatória, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
TNF- α	Receptor efetor pró-inflamatório, especialmente IL-6R, IL-13R, e IL-15R
TNF- α	Fator de coagulação, especialmente TF ou trombina
TNF- α	Fator de complemento, especialmente C3, C5, C3a, ou C5a

TNF- α	Proteína reguladora de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59, e mCRP
TNF- α	Antígeno ou receptor associado a câncer
LPS	Citocina efetora pró-inflamatória, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1, ou IL-6
LPS	Quimiocina efetora pró-inflamatória, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
LPS	Receptor efetor pró-inflamatório, especialmente IL-6R, IL-13R, e IL-15R
LPS	Fator de coagulação, especialmente TF ou trombina
LPS	Fator de complemento, especialmente C3, C5, C3a, ou C5a
LPS	Proteína reguladora de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59, e mCRP
TF ou trombina	Citocina efetora pró-inflamatória, especialmente MIF, HMGB-1, TNF- α , IL-1, ou IL-6
TF ou trombina	Quimiocina efetora pró-inflamatória, especialmente MCP-1, RANTES, MIP-1A, ou MIP-1B
TF ou trombina	Receptor efetor pró-inflamatório, especialmente IL-6R, IL-13R, e IL-15R
TF ou trombina	Fator de complemento, especialmente C3, C5, C3a, ou C5a
TF ou trombina	Proteína reguladora de complemento, especialmente CD46, CD55, CD59, e mCRP
TF ou trombina	Antígeno ou receptor associado a câncer

[00118] Ainda outras combinações, tais como as preferenciais para terapias para câncer, incluem anticorpos D20 + CD22, anticorpos CD74 + CD20, anticorpos CD74 + CD22, anticorpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), fator de crescimento semelhante a insulina (ILGF) + anticorpos CEACAM5, EGP-1 (por exemplo, RS-7) + anticorpos ILGF, CEACAM5 + anticorpos EGFR, IL6 + anticorpos CEACAM6. Tais anticorpos não precisam ser necessariamente usados em combinação, porém, podem ser combinados como proteínas de fusão de várias formas, tais como IgG, Fab, scFv, e semelhantes, conforme descritas na Patente U.S. N° 6.083.477; 6.183.744 e 6.962.702 e Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 20030124058; 20030219433; 20040001825;

20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 e 20060034759, a seção de Exemplos de cada uma é incorporada neste documento por referência.

DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)

[00119] Em modalidades preferenciais, um anticorpo bivalente ou multivalente é formado como um complexo DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143; 7.666.400; 7.858.070; 7.871.622; 7.906.121; 7.906.118; 8.163.291; 7.901.680; 7.981.398; 8.003.111 e 8.034.352, a seção de Exemplos de cada uma é incorporada no presente documento por referência.) Geralmente, a técnica toma vantagem das interações de ligação específicas e de alta afinidade que ocorrem entre uma sequência de domínio de dimerização e acoplamento (DDD) das subunidades reguladoras (R) de quinase protéica dependente de cAMP (PKA) e de uma sequência de domínio de ancoragem (AD) derivada de uma variedade de proteínas AKAP (Baillie *et al.*, *FEBS Letters*. 2005; 579: 3264. Wong e Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959). Os peptídeos DDD e AD podem ser ligados a uma proteína, peptídeo ou outra molécula. Visto que as sequências DDD dimerizam e se vinculam de forma espontânea a sequência AD, a técnica permite a formação de complexos entre qualquer molécula selecionada que pode ser ligada às sequências DDD ou AD.

[00120] Embora o complexo padrão da DNL™ compreender um trímer com duas moléculas ligadas a DDD unidas a uma molécula ligada a AD, as variações na estrutura complexa permitem a formação de dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, hexâmeros e outros multímeros. Em algumas modalidades, o complexo de DNL™ pode compreender dois ou mais anticorpos, fragmentos de anticorpos ou proteínas de fusão que se ligam ao

mesmo determinante antigênico ou a dois ou mais antígenos diferentes. O complexo de DNL™ também pode compreender um ou mais efetores, tais comoproteínas, peptídeos, imunomoduladores, citocinas, interleucinas, interferons, proteínas de ligação, ligantes de peptídeos, proteínas transportadoras, toxinas, ribonucleases tais como onconase, oligonucleotídeos inibidores tais como siRNA, antígenos ou xenoantígenos, polímeros tais como PEG, enzimas, agentes terapêuticos, hormônios, agentes citotóxicos, agentes anti-angiogênicos, agentes pró-apoptóticos e outras moléculas ou agregados.

[00121] A PKA, que exerce um papel central em um dos melhores caminhos de transdução de sinal estudados ativados pela ligação do segundo mensageiro cAMP às subunidades R, foi primeiramente isolada do músculo esquelético de coelhos em 1968 (Walsh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1968;243:3763). A estrutura da holoenzima consiste de duas subunidades catalíticas mantidas em uma forma inativa pelas subunidades R (Taylor, *J. Biol. Chem.* 1989;264:8443). Isozimas de PKA são encontradas em dois tipos de subunidades R (RI e RII), e cada tipo possui α e β isoformas (Scott, *Pharmacol. Ther.* 1991;50:123). Sendo assim, as quatro isoformas de subunidades reguladores de PKA são RI α , RI β , RII α e RII β . As subunidades R foram isoladas apenas como dímeros estáveis e o domínio de dimerização tem demonstrado consistir dos primeiros 44 resíduos amino-terminal de RII α (Newlon *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:222). Conforme discutido abaixo, porções similares de sequências de aminoácidos de outras subunidades reguladoras estão envolvidas na dimerização e acoplamento, cada uma localizada próximo do terminal N-terminal da subunidade reguladora. A ligação de cAMP nas subunidades R leva a liberação das subunidades catalíticas ativas para um espectro amplo das atividades da quinase serina/treonina que são orientadas em relação a substratos selecionados através de compartimentalização de PKA através do seu acoplamento com AKAPs (Scott *et*

al., *J. Biol. Chem.* 1990;265;21561)

[00122] Desde que a primeira AKAP, proteína-2 associada a microtúbulo foi caracterizada em 1984 (Lohmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81:6723), mais de 50 AKAPs de determinam vários sítios subcelulares, incluindo membrana plasmática, citoesqueleto de actina, núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático que foram identificados com diversas estruturas em espécies variando de leveduras até humanos (Wong e Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:959). AD de AKAPs para PKA é uma hélice anfipática de 14-18 resíduos (Carr *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1991;266:14188). As sequências de aminoácidos de AD são bem variadas entre AKAPs individuais, com as afinidades de ligação citadas para dímeros RII variando de 2 a 90 nM (Alto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:4445). As AKAPs se vincularão apenas a subunidades R diméricas. Para RII humano α , a AD se liga a superfície hidrofóbica formada por 23 resíduos amino-terminal (Colledge e Scott, *Trends Cell Biol.* 1999; 6:216). Sendo assim, o domínio de dimerização e domínio de ligação de AKAP de RII humano α estão ambos localizados dentro das mesmas 44 sequências de aminoácidos de N-terminal (Newlon *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:222; Newlon *et al.*, *EMBO J.* 2001;20:1651), que é denominado DDD no presente documento.

[00123] Desenvolvemos uma tecnologia de plataforma para utilizar o DDD de subunidades reguladoras de PKA humanas e a AD de AKAP como um par excelente de módulos de ligadores para acoplamento em duas entidades, mencionadas no presente documento como **A** e **B**, em um complexo não covalente que poderia ser bloqueado posteriormente em um complexo de DNLTM através da introdução de resíduos de cisteína tanto em DDD como em AD em posições estratégicas para facilitar a formação de ligações de dissulfetos. A metodologia geral de abordagem é a que se segue. A entidade é **A**

por ligar uma sequência DDD a um precursor de **A**, resultando em um primeiro componente doravante mencionado como **a**. Visto que a sequência DDD afetaria a formação espontânea de um dímero, **A** seria então formado por **a₂**. A Entidade **B** é construída pela ligação de uma sequência AD a um precurso de **B**, resultando em um segundo componente doravante mencionado como **b**. O motivo dimérico de DDD contido em **a₂** criará um sítio de acoplamento para ligação com a sequência AD contida em **b**, facilitando assim uma pronta associação de **a₂** e **b** para formar um complexo binário, trimérico composto por **a₂b**. O evento de ligação é feito de forma irreversível com uma reação subsequente para garantir covalentemente as duas entidades através de pontes de dissulfeto que ocorre de maneira muito eficiente com base no princípio de concentração local eficaz, pois as interações da ligação inicial trariam os grupos tiol reativos alocados tanto em DDD como AD para uma proximidade (Chmura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98:8480) para ligar sítios especificamente. Usando várias combinações de ligadores, módulos e precursores adaptadores, uma ampla variedade de construtos da DNL™ de diferentes estequiometrias podem ser produzidos e utilizados (vide, por exemplo, U.S. Nº 7,550,143; 7,521,056; 7,534,866; 7,527,787 e, 666,400.)

[00124] Por ligar o DDD e AD longe dos grupos funcionais de dois precursores, tais ligações específicas de sítios também podem preservar as atividades originais dos dois precursores. Esta abordagem é modular em natureza e, potencialmente, pode ser aplicada para ligar, de maneira específica e covalente com o sítio, uma ampla gama de substâncias, incluindo peptídeos, proteínas, anticorpos, fragmentos de anticorpos e outras frações efetores com um amplo alcance de atividades. Utilizando o método de proteína de fusão de efetores conjugados AD e DDD construtores descritos nos Exemplos abaixo, quase todas as proteínas ou peptídeos podem ser incorporados em um

construto de DNL™. No entanto, a técnica não é limitadora e outros métodos de conjugação podem ser utilizados.

[00125] Uma variedade de métodos é conhecida para criar proteínas de fusão, incluindo síntese de ácido nucleico, hibridização e/ou amplificação para reduzir um ácido nucleico sintético de cadeia dupla que codifica uma proteína de fusão de interesse. Tais ácidos nucleicos de cadeia dupla podem ser inseridos em vetores de expressão para produção de proteínas de fusão através de técnicas padronizadas de biologia molecular (vide, por exemplo. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd Ed, 1989). Em tais modalidades preferenciais, a fração de AD e/ou DDD pode ser ligada a extremidade N-terminal ou C-terminal de uma proteína ou peptídeo efetor. Contudo, o versado na técnica perceberá que o sítio de ligação de uma fração AD ou DDD em uma fração efetora pode variar dependendo da natureza química da fração efetora e a(s) parte(s) da fração efetora envolvida em sua atividade fisiológica. A ligação específica ao sítio de uma variedade de frações efetoras pode ser realizada usando técnicas conhecidas na arte, tais como o uso de reagentes de reticulação bivalentes e/ou outras técnicas de conjugação química.

[00126] Em várias modalidades, um anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser incorporado em um complexo da DNL™ por meio de, por exemplo, ligação de uma fração DDD ou AD em um terminal C-terminal de uma cadeia pesada de anticorpos, conforme descrita em detalhes abaixo. Em modalidades mais preferenciais, a fração de DDD ou AD, mais preferencialmente a fração de AD, pode ser ligada ao terminal C-terminal da cadeia leve de anticorpos (vide, por exemplo U.S. Patent Appl. Nº de Sérir 13/901,737, depositado em 24/05/13, a seção de Exemplo foi incorporada no presente documento por refereência.)

Relacionamentos Estrutura-Função em Frações de AD e DDD

[00127] Para diferentes tipos de construtos da DNL™, podem ser usadas sequências diferentes de AD ou DDD. As sequencias exemplificativas de DDD e D são apresentadas abaixo.

DDD1

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

DDD2

CGHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

AD1

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

AD2

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

[00128] O versado na técnica perceberá que DDD1 e DDD2 são baseados na sequência DDD da isoforma RII α humana da proteína quinase A. Entretanto, em modalidades alternativas, as frações de DDD e AD podem ser baseadas na sequência DDD da forma RI α humana da proteína quinase A e uma sequência AKAP correspondente, conforme exemplificado em DDD2, DDD3C e AD3 abaixo.

DDD3

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:5)

DDD3C

MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:6)

AD3

CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:7)

[00129] Em outras modalidades alternativas, outras variantes de

sequência de fração de AD e/ou DDD podem ser usadas na construção de complexos de DNL™. Por exemplo, existem apenas quatro variantes de sequências PKA DDD humanas correspondendo às frações de DDD de PKA RI α , RI α , RI β e RI β . A sequência RI α DDD é baseada em DDD1 e DDD2 divulgada acima. As quatro sequências PKA DDD humanas são mostradas abaixo. A sequência DDD representa resíduos 1-44 de RI α , 1-44 de RI β , 12-61 de RI α e 13-66 e RI β . (Observe que a sequência de DDD1 é levemente modificada da fração de PKA RI α DDD humana.)

PKA RI α

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:8)

PKA RI β

SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO:9)

PKA RI α

SHIQIPPGLELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:10)

PKA RI β

SIEIPAGLLELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO:11)

[00130] Os relacionamentos estrutura-função dos domínios AD e DDD foram sujeitos à investigação. (Vide, por exemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, *Protein Sci* 14:2982-92; Carr et al., 2001, *J Biol Chem* 276:17332-38; Alto et al., 2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445-50; Hundsucker et al., 2006, *Biochem J* 396:297-306; Stokka et al., 2006, *Biochem J* 400:493-99; Gold et al., 2006, *Mol Cell* 24:383-95; Kinderman et al., 2006, *Mol Cell* 24:397-408, o texto completo de cada um foi incorporado no presente documento por referência.)

[00131] Por exemplo, Kinderman et al. (2006, *Mol Cell* 24:397-408) examinado a estrutura de cristal da interação de ligação de AD-DDD e

concluído que a sequência DDD humana continha inúmeros resíduos de aminoácidos conservados que foram importantes tanto na formação de dímeros ou ligação de AKAP, sublinhados na SEQ ID NO:1 abaixo. (Veja Figura 1 de Kinderman et al., 2006, incorporado no presente documento por referência.) O versado na técnica perceberá que ao criar as variantes de sequência da sequência de DDD, alguém deveria evitar de forma desejável alterar os resíduos sublinhados, enquanto que as substituições de aminoácidos conservativos podem ser feitas por resíduos que são menos críticos para dimerização e ligação de AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

[00132] Conforme discutido em mais detalhes abaixo, substituições de aminoácidos conservativos foram caracterizadas para cada vinte L-aminoácidos comuns. Sendo assim, com base nos dados de Kinderman (2006) e nas substituições de aminoácidos conservativos, as sequências DDD alternativas e potenciais baseadas em SEQ ID NO:1 são mostradas na **Tabela 2**. No desenvolvimento da **Tabela 2** apenas substituições de aminoácidos altamente conservativos foram consideradas. Por exemplo, resíduos carregados foram apenas substituídos por resíduos da mesma carga, resíduos com cadeias laterais menores foram substituídos por resíduos de tamanho similar, cadeias laterais de hidroxila foram apenas substituídas por outras hidroxilas, etc. Devido ao efeito único da prolina na estrutura secundária de aminoácido, nenhum outro resíduo foi substituído por prolina. Um número limitado de tais sequências de frações DDD alternativas e potenciais são mostradas na SEQ ID NO:12 até SEQ ID NO:31 abaixo. O versado na técnica perceberá que um número quase ilimitado de espécies alternativas dentro do gênero de frações de DDD pode ser construído por técnicas padrão, por exemplo, usando sintetizador de peptídeo comercial ou técnicas bem

conhecidas de mutagênese direcionada ao sítio. O efeito de substituições de aminoácidos na ligação de fração de AD também pode ser prontamente determinado por ensaios de ligação padrão, por exemplo, conforme divulgado em Alto et al. (2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445-50).

Tabela 2. Substituições de Aminoácidos Conservativos DDD1 (SEQ ID NO:1). Sequência consensual divulgada como SEQ ID NO:87.

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	I	V

THIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:12)

SKIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

SRIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)

SHINIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:15)

SHIQIPPALELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:16)

SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:17)

SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:18)

SHIQIPPGLELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:19)

SHIQIPPGLELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)

SHIQIPPGLELLQGYSVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:21)

SHIQIPPGLELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:22)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:23)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRNQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:24)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:25)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPELVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:26)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:27)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:28)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:29)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:30)

SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO:31)

[00133] Alto et al. (2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445-50) realizou uma análise bioformática da sequência AD de várias proteínas AKAP para criar uma sequência AD seletiva RII chamada de AKAP-IS (SEQ ID NO:3), com uma ligação constante para DDD de 0,4 nM. A sequência AKAP-IS foi criada como um antagonista de peptídeo de AKAP ligando a PKA. Resíduos na sequência de AKAP-IS onde as substituições tenderam a diminuir a ligação com DDD são destacadas na SEQ ID NO:3 abaixo. O versado na técnica perceberá que ao criar as variantes de sequência da sequência de AD, alguém deveria evitar de forma desejável alterar os resíduos sublinhados, enquanto que as substituições de aminoácidos conservativos podem ser feitas por resíduos que são menos críticos para dimerização e ligação de DDD. A **Tabela 3** mostra as substituições de aminoácidos conservativos e potenciais na sequência de AKAP-IS (AD1, SEQ ID NO:3), semelhante à mostrada para DDD1 (SEQ ID NO:1) na **Tabela 2** acima.

[00134] Um número limitado de tais sequências de frações AD alternativas e potenciais são mostradas na SEQ ID NO:32 até SEQ ID NO:49 abaixo. Novamente, um número muito grande de espécies dentro do gênero de possíveis sequências de frações AD poderiam ser feitas, testadas e usadas pelo versado na técnica com base nos dados de Alto et al. (2003). Nota-se que a Figura 2 de Alto (2003) mostra um número ainda maior de substituições de aminoácidos potenciais que pode ser feitas, enquanto que retém a atividade de ligação com frações de DDD com base em experimentos de ligação atuais.

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

Tabela 3. Substituições de Aminoácidos Conservativos em AD1 (SEQ ID NO:3). Sequência consensual divulgada como SEQ ID NO:88.

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	L	D	F	I		R	N			E	Q			N	N	L

NIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:32)

QLEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:33)

QVEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:34)

QIDYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:35)

QIEFLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:36)

QIETLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:37)

QIESLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:38)

QIEYIAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:39)

QIEYVAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:40)

QIEYLARQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:41)

QIEYLAKNIVDNAIQQA (SEQ ID NO:42)

QIEYLAKQIVENAIQQA (SEQ ID NO:43)

QIEYLAKQIVDQAIQQA (SEQ ID NO:44)

QIEYLAKQIVDNAINQA (SEQ ID NO:45)

QIEYLAKQIVDNAIQNA (SEQ ID NO:46)

QIEYLAKQIVDNAIQQL (SEQ ID NO:47)

QIEYLAKQIVDNAIQI (SEQ ID NO:48)

QIEYLAKQIVDNAIQQV (SEQ ID NO:49)

[00135] Gold et al. (2006, *Mol Cell* 24:383-95) utilizou a cristalografia e triagem de peptídeos para desenvolver uma sequência SuperAKAP-IS (SEQ ID

NO:50), exibindo uma quinta ordem de seletividade de magnitude maior para a isoforma RII de PKA comparada com a isoforma RI. Os resíduos destacados indicam as posições das substituições de aminoácidos relativas a sequência AKAP-IS que aumentou a ligação com a fração DDD de RII α . Nesta sequência, o resíduo Q de N-terminal é numerado como resíduo número 4 e o resíduo A de C-terminal é resíduo número 20. Os resíduos nos quais poderiam ser feitas substituições para afetar a afinidade de RII α foram os resíduos 8, 11, 15, 16, 18, 19 e 20 (Gold et al., 2006). É contemplado que em determinadas modalidades alternativas, a sequência SuperAKAP-IS pode ser substituída pela sequência da fração AKAP-IS AD para preparar construtos de DNL™. Outras sequência alternativas que podem ser substituídas pela sequência AKAP-IS AD são mostradas em SEQ ID NO:51-53. As substituições relativas a sequência AKAP-IS são destacadas. É antecipado que, assim como a sequência AD2 mostrada na SEQ ID NO:4 a fração de AD também pode incluir cisteínas e glicinas de resíduos de N-terminal adicionais e glicinas e cisteínas de resíduos de C-terminal.

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:50)

Sequências alternativas de AKAP

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:51)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:52)

QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:53)

[00136] A Figura 2 de Gold et al, divulgou sequências adicionais de ligação com DDD a partir de uma variedade de proteínas AKAP, mostrada abaixo.

AKAPs específicos de RII

AKAP-KL

PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)

AKAP79

LLIETASSLVKNQAIQLSI (SEQ ID NO:55)

AKAP-Lbc

LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)

AKAPs específicos de RI

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)

RIAD

LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)

PV38

FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:59)

AKAPs de Especificidade Dupla

AKAP7

ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:60)

MAP2D

TAAEV SARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO:61)

DAKAP1

QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:62)

DAKAP2

LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO:63)

[00137] Stokka et al. (2006, *Biochem J* 400:493-99) também desenvolveu competidores de peptídeos de ligação com AKAP para PKA, mostrados na SEQ ID NO:64-66. Os antagonistas de peptídeos foram designados como Ht31 (SEQ ID NO:64), RIAD (SEQ ID NO:65) e PV-38 (SEQ ID NO:66). O peptídeo Ht-31 exibiu uma afinidade maior para a isoforma RII de PKA, enquanto que RIAD e PV-38 demonstraram afinidade maior por RI.

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:64)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:65)

PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:66)

[00138] Hundsucker et al. (2006, *Biochem J* 396:297-306)

desenvolveu ainda outros competidores de peptídeos para ligação com AKAP para PKA com uma constante de ligação inferior a 0,4 nM para o DDD da forma RII de PKA. As sequências de vários peptídeos antagonistas de AKAP são fornecidas na Tabela 1 de Hundsucker et al., reproduzido na **Tabela 4** abaixo. AKAPIS representa um peptídeo de ligação com subunidade RII sintético. Todos os outros peptídeos são derivados de domínios de ligação com RII dos AKAPs indicados.

Tabela 4. Sequências de peptídeos AKAPSequências de Peptídeos

AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
AKAP7δ-wt-pep	PEDAEVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
AKAP7δ-L304T-pep	PEDAEVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
AKAP7δ-L308D-pep	PEDAEVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
AKAP7δ-P-pep	PEDAEVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
AKAP7δ-PP-pep	PEDAEVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
AKAP7δ-wt-pep	PEDAEVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:75)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)

AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMINSDIMMQA (SEQ ID NO:80)
AKAP11-pep	VNLDDKAVLAEKIVAEAIEKAEREL (SEQ ID NO:81)
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
AKAP14-pep	TQDKNYEDELTQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

[00139] Resíduos que foram altamente conservados entre os domínios de AD de proteínas AKAP diferentes são indicados abaixo por destacar com referência a sequência AKAP IS (SEQ ID NO:3). Os resíduos são os mesmos observados por Alto et al. (2003) com a adição do resíduo alanina C-terminal. (veja FIG. 4 de Hundsrucker et al. (2006), incorporado no presente documento por referência.) As sequências de antagonistas de peptídeos com afinidades especialmente altas para a sequência DDD de RII foram aqueles de AKAP-IS, AKAP7δ-wt-pep, AKAP7δ-L304T-pep e AKAP7δ-L308D-pep.

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[00140] Carr et al. (2001, *J Biol Chem* 276:17332-38) examinou o grau de homologia de sequências entre diferentes sequências DDD de ligação com AKAP a partir de proteínas humanas e não humanas e identificou resíduos nas sequências de DDD que apareceram ser as mais altamente conservadas entre as diferentes frações de DDD. Estes são indicados abaixo por destacar com referência à sequência DDD de RII α de PKA de SEQ ID NO:1. Os resíduos que foram particularmente conservados são indicados posteriormente em itálico. Os resíduos se sobrepõem, porém, não são idênticos àqueles sugeridos por Kinderman et al. (2006) para serem importantes para a ligação com proteínas

AKAP. O versado na técnica perceberá que ao criar as variantes da sequência de DDD seria mais preferencial evitar mudar os resíduos mais conservados (em itálico) e seria preferencial também evitar alterar os resíduos conservados (destacados), embora as substituições de aminoácidos conservativos possam ser consideradas para resíduos que não estão nem sublinhados tampouco em itálico.

SHIQ/PPGLTELQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

[00141] Um conjunto modificado de substituições de aminoácidos conservativos para a sequência DDD1 (SEQ ID NO:1) com base nos dados de Carr et al. (2001) é mostrada na **Tabela 5**. Mesmo com este conjunto reduzido de sequências substituídas existem inúmeras sequências de frações DDD alternativas possíveis que podem ser produzidas, testadas e usadas pelo versado na técnica sem experimentação indevida. O versado na técnica poderia produzir prontamente tais sequências de aminoácidos de DDD conforme divulgadas acima na **Tabela 2** e **Tabela 3**.

Tabela 5. Substituições de Aminoácidos Conservativos DDD1 (SEQ ID NO:1). Sequência consensual divulgada como SEQ ID NO:89.

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T			N					S									I				
																	L				

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N									I	D				S	K		K		L	I	V
									L	A											

[00142] O versado na técnica perceberá que estas e outras substituições de aminoácidos nas sequências de DDD e AD podem ser usadas para produzir espécies alternativas dentro do gênero das frações de AD ou

DDD, usando técnicas que são padronizadas no campo e apenas para experimentação de rotina.

Alótipos de Anticorpos

[00143] A imunogenicidade de anticorpos terapêuticos está associada com risco aumentado de reações de infusão e duração diminuída de resposta terapêutica (Baert et al., 2003, *N Engl J Med* 348:602-08). À medida que os anticorpos terapêuticos induzem uma resposta imune no hospedeiro pode ser determinada em parte pelo alótipo do anticorpo (Stickler et al., 2011, *Genes and Immunity* 12:213-21). O alótipo de anticorpo é relativo às variações da sequência de aminoácidos em locais específicos nas sequências de regiões constantes do anticorpo. Os alótipos dos anticorpos de IgG que contém uma região constante γ -tipo de cadeia pesada são designados como alótipos de Gm (1976, *J Immunol* 117:1056-59).

[00144] Para os anticorpos humanos comuns de IgG1 o alótipo mais prevalente é G1m1 (Stickler et al., 2011, *Genes and Immunity* 12:213-21). No entanto, o alótipo G1m3 também ocorre frequentemente em caucasianos (*Id.*). Foi relatado que os anticorpos G1m1 contém sequências alotípicas que tendem a induzir uma resposta imune quando administrados a recipientes não G1m1 (nG1m1), tais como pacientes com G1m3 (*Id.*). Anticorpos do alótipo não G1m1 não são imunogênicos quando administrados para pacientes com G1m1 (*Id.*).

[00145] O alótipo G1m1 humano compreende ácidos aspártico de aminoácidos no Kabat posição 356 e leucina no Kabat posição 358 na sequência CH3 do IgG1 de cadeia pesada. O alótipo nG1m1 compreende o ácido glutâmico de aminoácidos no Kabat posição 356 e metionina no Kabat posição 358. Os alótipos G1ml e nG1ml compreendem um resíduo de ácido glutâmico no Kabat posição 357 e os alótipos são algumas vezes mencionadas como alótipos DEL e EEM. Um exemplo não limitante de sequências de região constante de cadeia

pesada para anticorpos de alótipo de G1m1 e nG1m1 é mostrado para os anticorpos exemplificativos rituximabe (SEQ ID NO:85) e veltuzumabe (SEQ ID NO:86).

Sequências de região variável de cadeia pesada de Rituximabe (SEQ ID NO:85)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSG
 LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**K**AEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**ELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Região variável de cadeia pesada de Veltuzumabe (SEQ ID NO:86)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSG
 LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**R**VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**R**EE**M**TK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00146] Jefferis e Lefranc (2009, *mAbs* 1:1-7) revisaram a característica de variações nas sequências de alótipos IgG e seus efeitos na imunogenicidade. Eles relataram que o alótipo G1m3 é caracterizado por um resíduo de arginina no Kabat posição 214 em comparação com um resíduo de lisina no Kabat 214 no alótipo G1m17. O alótipo nG1m1,2 foi caracterizado pelo ácido glutâmico no Kabat posição 356, metionina no Kabat posição 358 e alanina no Kabat posição 431. O alótipo nG1m1,2 foi caracterizado pelo ácido glutâmico no Kabat posição 356, metionina no Kabat posição 358 e alanina no Kabat posição 431. Além das variantes de sequência de região constante de cadeia pesada, Jefferis e Lefranc

(2009) relataram variantes alotípicos na região constante de cadeia leve de kappa com o alótípico Km1 caracterizado por valina no Kabat posição 153 e leucina e leucina no Kabat posição 191, o alótípico Km1,2 por alanina no Kabat posição 153 e leucina no Kabat posição 191 e o alótípico Km3 caracterizado por alanina no Kabat posição 153 e valina no Kabat posição 191.

[00147] Com respeito a anticorpos terapêuticos, veltuzumabe e rituximabe são, respectivamente, anticorpos IgG1 humanizados e quiméricos contra CD20 para uso em terapia com uma ampla variedade de malignidades hematológicas. **A Tabela 6** compara as sequências de alótípicos de rituximabe vs. veltuzumabe. Conforme mostrado na **Tabela 6**, rituximabe (G1m17,1) é um DEL de alótípico IgG1 com uma variação de sequência adicional no Kabat posição 214 (CH1 de cadeia pesada) de lisina em rituximabe vs. arginina em veltuzumabe. Relatou-se que veltuzumabe é menos imunogênico em sujeitos do que rituximabe (*vide, por exemplo*, Morschhauser et al., 2009, *J Clin Oncol* 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, *Blood* 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, *BioDrugs* 25:13-25), e o efeito que foi atribuído à diferença entre anticorpos humanizados e quiméricos. Contudo, a diferença nos alótípicos entre alótípicos de EEM e DEL também conta para a imunogenicidade inferior de veltuzumabe.

Tabela 6. Alótípicos de Rituximabe vs. Veltuzumabe

		<i>Posição de cadeia pesada e alótípicos associados</i>						
		<i>Alótípico completo</i>		<i>214</i> <i>(alótípico)</i>	<i>356/358</i> <i>(alótípico)</i>	<i>431</i> <i>(alótípico)</i>		
<i>Rituximabe</i>	<i>G1m17,1</i>	<i>K</i>	<i>17</i>	<i>D/L</i>	<i>1</i>	<i>A</i>	<i>-</i>	
<i>Veltuzumabe</i>	<i>G1m3</i>	<i>R</i>	<i>3</i>	<i>E/M</i>	<i>-</i>	<i>A</i>	<i>-</i>	

[00148] A fim de reduzir a imunogenicidade de anticorpos terapêuticos em indivíduos de genótipo nG1m1, é desejável escolher o alótípico do anticorpo para corresponder ao alótípico de G1m3, caracterizado por arginina no Kabat 214,

e o nG1m1,2 alótipo nulo, caracterizado por ácido glutâmico no Kabat posição 356, metionina no Kabat posição 358 e alanina no Kabat posição 431. Surpreendentemente, descobriu-se que a administração subcutânea repetida de anticorpos G1m3 por um longo período de tempo não resultou em uma resposta imune significativa. Em modalidades alternativas, a cadeia pesada IgG4 humana em comum com o alótipo G1m3 possui arginina no Kabat 214, ácido glutâmico no Kabat 356, metionina no Kabat 359 e alanina no Kabat 431. Uma vez que a imunogenicidade parece estar relacionada pelo menos em parte aos resíduos nestes naqueles locais, o uso de sequência de região constante de cadeia pesada IgG4 humana para anticorpos terapêuticos também é uma modalidade preferencial. Combinações de anticorpos G1m3 IgG1 com anticorpos IgG4 também podem ser de uso para administração de terapêuticos.

Substituições de Aminoácidos

[00149] Em modalidades alternativas, os métodos e composições divulgados podem envolver produção e uso de proteínas ou peptídeos com um ou mais resíduos de aminoácidos substituídos. Por exemplo, as sequências DDD e/ou AD usadas para construtos da DNL™ podem ser modificados conforme discutido acima.

[00150] O versado na técnica perceberá que, em geral, substituições de aminoácidos geralmente envolvem a substituição de um aminoácido com outro aminoácido de proteínas relativamente semelhantes (por exemplo, substituições de aminoácidos conservativos). As propriedades de vários aminoácidos e o efeito da substituição de aminoácidos na estrutura e função e proteínas foi sujeito a estudo e conhecimento extensivo na técnica.

[00151] Por exemplo, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado (Kyte & Doolittle, 1982, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132). A característica hidropática relativa do aminoácido contribui para a estrutura secundária de

proteínas resultantes que, por sua vez, define a interação da proteína com outras moléculas. Cada aminoácido foi atribuído a um índice hidropático com base na sua hidrofobicidade e características de carga (Kyte & Doolittle, 1982), os quais são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5). Ao fazer substituições conservativas, o uso de aminoácidos nos quais os índices hidropáticos estão dentro de ± 2 é preferencial, dentro ± 1 são mais preferenciais, e dentro de $\pm 0,5$ são ainda mais preferenciais.

[00152] A substituição de aminoácidos podem também tomar em conta a hidrofobicidade do resíduo de aminoácido (por exemplo, Pat. U.S. Nº 4.554.101). Os valores de hidrofobicidade foram atribuídos a resíduos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicine (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 .+- .1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). A substituição de aminoácidos por outros de hidrofobicidade semelhante é preferencial.

[00153] Outras considerações incluem o tamanho da cadeia lateral de aminoácidos. Por exemplo, geralmente, não seria preferencial substituir um aminoácido com uma cadeia lateral compacta, tal como glicina ou serina, por um aminoácido com uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, triptofano ou tirosina. O efeito de vários resíduos de aminoácidos na estrutura secundária da proteína é também uma consideração. Através de estudo empírico, o efeito de diferentes resíduos de aminoácidos na tendência de domínios protéicos para

adotar uma estrutura de alfa-hélice, folha-beta ou estrutura secundária de viés reverso foi determinada e é conhecida na técnica (vide, por exemplo, Chou & Fasman, 1974, *Biochemistry*, 13:222-245; 1978, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276; 1979, *Biophys. J.*, 26:367-384).

[00154] Com base em tais considerações e estudo empírico extensivo, as tabelas de substituições de aminoácidos conservativos foram construída e são conhecidas na técnica. Por exemplo, arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina. Alternativamente: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu; Cis (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gln, asp; Gly (G) ala; His (H) asn, gln, lys, arg; Ile (I) val, met, ala, phe, leu; Leu (L) val, met, ala, phe, ile; Lys (K) gln, asn, arg; Met (M) phe, ile, leu; Phe (F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro (P) ala; Ser (S), thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe, tyr; Tyr (Y) trp, phe, thr, ser; Val (V) ile, leu, met, phe, ala.

[00155] Outras considerações para substituições de aminoácidos incluem se o resíduo está ou não localizado no interior de uma proteína ou se está exposto a solventes. Para resíduos internos, as substituições conservativas incluiriam: Asp e Asn; Ser e Thr; Ser e Ala; Thr e Ala; Ala e Gly; Ile e Val; Val e Leu; Leu e Ile; Leu e Met; Phe e Tyr; Tyr e Trp. (Vide, por exemplo, PROWL no site rockefeller.edu). Para resíduos expostos a solventes, as substituições conservativas incluiriam: Asp e Asn; Asp e Glu; Glu e Gln; Glu e Ala; Gly e Asn; Ala e Pro; Ala e Gly; Ala e Ser; Ala e Lys; Ser e Thr; Lys e Arg; Val e Leu; Leu e Ile; Ile e Val; Phe e Tyr. (Id.)) Várias matrizes foram construídas para auxiliar na seleção de substituições de aminoácidos, tais como matriz de pontuação PAM250, matriz de Dayhoff, matriz de Grantham, matriz de McLachlan, matriz de Doolittle, matriz de Henikoff, matriz de Miyata, matriz de Fitch, matriz de Jones, matriz de Rao, matriz de Levin e matriz de Risler (*Idem.*)

[00156] Na determinação de substituições de aminoácidos, alguém também pode considerar a existência de ligações intermoleculares ou intramoleculares, tais como formação de ligações iônicas (pontes de sal) entre resíduos positivamente carregados (por exemplo, His, Arg, Lys) e resíduos negativamente carregados (por exemplo, Asp, Glu) e ligações de dissulfeto entre resíduos de cisteína próximos.

[00157] Os métodos para substituição de qualquer aminoácido por outros aminoácidos em uma sequência de proteína codificada são bem conhecidos e uma questão de experimentação de rotina para o versado na técnica, por exemplo, pela técnica de mutagênese direcionada ao sítio ou por síntese e montagem de codificação de oligonucleotídeos uma substituição de aminoácidos e splicing em um construto de vetor de expressão.

Avímeros

[00158] Em determinadas modalidades, as frações de ligação descritas neste documento podem compreender uma ou mais sequências de avímeros. Os avímeros são uma classe de proteínas de ligação semelhantes em alguns aspectos a anticorpos nas suas afinidades e especificidades para várias moléculas alvo. Eles foram desenvolvidos a partir de domínios de receptores extracelulares por reorganização de exons *in vitro* e *phage display*. (Silverman et al., 2005, *Nat. Biotechnol.* 23:1493-94; Silverman et al., 2006, *Nat. Biotechnol.* 24:220). As proteínas de multidomínios resultantes podem compreender domínios múltiplos de ligação independentes que podem exibir afinidade melhorada (em alguns casos sub-nanomolar) e especificidade comparada com proteínas de ligação com epítopos únicos. (*Id.*) Em várias modalidades, os avímeros podem ser ligados a, por exemplo, sequências DDD e/ou AD para uso em métodos e composições reivindicadas. Os detalhes adicionais concernentes aos métodos de construção e uso de avímeros são

divulgados, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 e 20050221384, a seção de Exemplos foi incorporada no presente documento por referência.

Phage display

[00159] Determinadas modalidades das composições e/ou métodos reivindicados podem dizer respeito a peptídeos de ligação e/ou imitação de peptídeos miméticos de várias moléculas, células ou tecidos alvo. Os peptídeos de ligação podem ser identificados por qualquer método conhecido na técnica, inclusive, porém não se limitando, à técnica de *phage display*. Vários métodos de *phage display* e técnicas para produção de populações diversas de peptídeos são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, Pat. U.S. Nº 5,223,409; 5,622,699 e 6,068,829 métodos divulgados para preparação de uma biblioteca de phage. A técnica de *phage display* envolve a manipulação genética de bacteriófagos de forma que peptídeos pequenos possam ser expressos em suas superfícies (Smith e Scott, 1985, *Science* 228:1315-1317; Smith e Scott, 1993, *Meth. Enzymol.* 21:228-257). Além dos peptídeos, domínios de proteínas maiores tais como anticorpos de cadeia única também podem ser exibidos na superfície de partículas de fago (Arap *et al.*, 1998, *Science* 279:377-380).

[00160] O direcionamento de sequências de aminoácidos seletivas para um dado órgão, tecido, tipo de célula ou molécula alvo pode ser isolado por peneiramento (Pasqualini e Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162). De forma resumida, uma biblioteca de phage contendo supostos peptídeos de direcionamento é administrada para um organismos intacto ou órgãos, tecidos, tipos de células ou moléculas alvo isoladas e amostras contendo fagos vinculados são coletadas. O fago que se liga a um alvo pode ser eluído de um órgão, tecido, tipo de célula alvo ou molécula alvo e, então, amplificado por cultivo na

bactéria hospedeira.

[00161] Em determinadas modalidades, o fago pode ser propagado na bactéria hospedeira entre rodadas de peneiramento. Ao invés de ser lisado pelo fago, a bactéria pode secretar múltiplas cópias do fago que exigem uma inserção especial. Se desejado, o fago amplificado pode ser novamente exposto aos órgãos, tecidos, tipos de células ou moléculas alvo e coletado para rodadas adicionais de peneiramento. Rodadas múltiplas de peneiramento podem ser realizadas até que uma população de ligantes seletivos ou específicos seja obtida. A sequência de aminoácidos de peptídeos pode ser determinada pelo sequenciamento do DNA correspondendo a inserção do peptídeo de direcionamento no genoma do fago. O peptídeo de direcionamento identificado podem então ser produzido como um peptídeo sintético por técnicas padronizadas de química de proteínas (Arap *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1985).

[00162] Em algumas modalidades, o protocolo de subtração pode ser usado para reduzir a ligação de fago de base. O propósito da subtração é remover o fago da biblioteca que se liga a alvos, exceto o alvo de interesse. Em modalidades alternativas, a biblioteca de fago pode ser pré-triada contra uma célula, tecido ou órgão controle. Por exemplo, os peptídeos de ligação com tumores podem ser identificados após a pré-triagem de uma biblioteca contra uma linha celular normal de controle. Após a subtração, a biblioteca pode ser triada contra a molécula, célula, tecido ou órgão de interesse. Outros métodos de protocolos de subtração são conhecidos e podem ser usados na prática dos métodos reivindicados, por exemplo, conforme divulgado nas Patentes U.S. N°s. 5.840.841. 5.705.610. 5.670.312 e 5.492.807.

Aptâmeros

[00163] Em determinadas modalidades, uma fração de

direcionamento de uso pode ser um aptâmero. Métodos de construção e determinação de características de ligação de aptâmeros são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, tais técnicas são descritas na Patente U.S. Nº 5.582.981. 5.595.877 e 5.637.459, a seção de Exemplos de cada um está incorporada no presente documento por referência. Os métodos para preparação e triagem de aptâmeros que se ligam a alvos de interesse em especial são bem conhecidos na técnica, por exemplo, Pat. U.S. Nº 5.475.096 e U.S. Pat. No. 5.270.163, a seção de Exemplos de cada um está incorporada no presente documento por referência.

[00164] Os aptâmeros podem ser preparados por métodos conhecidos, incluindo métodos sintéticos, recombinantes e de purificação, e podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros ligantes específicos para o mesmo alvo. Em geral, um mínimo de aproximadamente 3 nucleotídeos, preferencialmente 5 nucleotídeos, são necessários para efetivar uma ligação específica. Aptâmeros de sequências menores do que 10 bases pode ser viáveis, apesar dos aptâmeros de 10, 20, 30 ou 40 nucleotídeos poderem ser preferenciais.

[00165] Aptâmeros podem ser isolados, sequenciados e/ou amplificados ou sintetizados como moléculas de DNA ou RNA convencionais. Alternativamente, aptâmeros de interesse podem compreender oligômeros modificados. Qualquer grupo de hidroxila comumente presente nos aptâmeros pode ser substituído por grupos de fosfonato, grupos de fosfato, protegidos por um grupo protetor padrão, ou ativados para preparar ligações adicionais para outros nucleotídeos ou para serem conjugados a suportes sólidos. Uma ou mais ligações de fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativa, tal como P(O)O substituído por P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', CO, ou CNR₂, de onde R é H ou alkyl (1-20C) e R' é alkyl (1-20C); além disso, este

grupo pode ser ligado a nucleotídeos adjacentes através de O ou S. Nem todas as ligações em um oligômero necessitam ser idênticas.

Affibodies e Fynomers

[00166] Determinadas modalidades alternativas podem usar *Affibodies* em lugar de anticorpos. *Affibodies* são disponibilizados comercialmente pela *Affibody AB* (Solna, Suécia). *Affibodies* são proteínas pequenas que funcionam como anticorpos miméticos e são de uso na ligação de moléculas alvo. *Affibodies* foram desenvolvidos por manipulação combinatória em uma estrutura de suporte de proteína alfa-hélice (Nord et al., 1995, *Protein Eng* 8:601-8; Nord et al., 1997, *Nat Biotechnol* 15:772-77). O desenho do *Affibody* é baseado em uma estrutura de feixe de três hélices compreendendo o domínio de ligação IgG da proteína A (Nord et al., 1995; 1997). Affibodies com uma ampla gama de afinidades de ligação podem ser produzidos por randomização de treze aminoácidos na atividade de ligação de Fc da proteína bacteriana A (Nord et al., 1995; 1997). Após a randomização, a biblioteca amplificada de PCR foi clonada em um vetor de fagémido para triagem por *phage display* das proteínas mutantes. A biblioteca de *phage display* pode ser triada contra qualquer antígeno conhecido, usando técnicas de triagem de *phage display* padronizadas (por exemplo, Pasqualini e Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162), a fim de identificar um ou mais *Affibodies* contra o antígeno alvo.

[00167] Um *Affibody* marcado por ^{177}Lu específico para HER2/neu demonstrou direcionar xenoenxertos que expressam HER2 *in vivo* (Tolmachev et al., 2007, *Cancer Res* 67:2773-82). Apesar da toxicidade renal devido à acumulação de compostos marcados por substâncias radioativas de peso molecular baixo ter sido inicialmente um problema, a ligação reversível com albumina reduziu a acumulação renal, permitindo a terapia com base em

radionuclídeos com *Affibody* marcado (*Id.*).

[00168] A viabilidade do uso de *Affibodies* marcados por substâncias radioativas por processamento de imagens tumorais *in vivo* foi recentemente demonstrada (Tolmachev et al., 2011, *Bioconjugate Chem* 22:894-902). Uma NOTA derivatizada de maleimida foi conjugada ao *Affibody* anti-HER2 e radiomarcado com ^{111}In (*Id.*). A administração para camundongos portando o xenoenxerto de DU-145 que expressam HER2, após processamento de imagens pela câmara de cintilação, permitiu a visualização do xenoenxerto (*Id.*).

[00169] *Fynomers* também podem ser ligar a antígenos alvo com uma afinidade e especificidade semelhantes a anticorpos. *Fynomers* são baseados no domínio Fyn SH3 humano como uma estrutura de suporte para montagem de moléculas de ligação. O domínio Fyn SH3 é uma proteína com 63 aminoácidos totalmente humana que pode ser produzida em bactérias com rendimentos altos. *Fynomers* podem ser ligados em conjunto para resultar em uma proteína de ligação multiespecífica com afinidades para dois ou mais alvos de antígenos diferentes. *Fynomers* são disponibilizados comercialmente pela COVAGEN AG (Zurich, Suíça).

[00170] O versado na técnica perceberá que os *Affibodies* ou *Fynomers* podem ser usados como moléculas de direcionamento na prática dos métodos e composições reivindicadas.

Protocolos de Conjugação

[00171] O protocolo de conjugação preferencial é baseado em uma reação tiol-maleimida, tiol-vinilsulfona, tiol-bromoacetamida ou tiol-iodoacetamida que é simples em pH neutro ou ácido. Isto descarta a necessidade por condições de pH maiores para conjugações que, por exemplo, seriam necessárias quando utilizar ésteres ativos. Detalhes adicionais de protocolos de conjugação estão descritos abaixo na seção de exemplos.

Tratamento Terapêutico

[00172] Em outro aspecto, a invenção se relaciona a um método de tratamento de um sujeito, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um conjugado terapêutico conforme descrito no presente documento para um sujeito. Doenças que podem ser tratadas com conjugados terapêuticos descritas no presente documento incluem, porém não se limitam a, malignidades de células B (por exemplo, linfoma não Hodgkin, linfoma de células do manto, mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin, linfoma difuso de célula B grande, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia de célula pilosa) usando, por exemplo, um anticorpo anti-CD22 tal como o hLL2 MAb (epratuzumabe, *vide* Patente U.S. N° 6,183,744), contra oito epítopo CD22 (hRFB4) ou anticorpos contra outros抗ígenos de células B, tais como CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD37, CD40, CD40L, CD52, CD74, CD80 ou HLA-DR. Outras doenças incluem, porém não se limitam a, adenocarcinomas do epitélio do sistema digestivo derivado endodermicamente, câncer tal como câncer de mama e câncer de pulmão de células não pequenas e outros carcinomas, sarcomas, tumores da glia, leucemias mieloides, etc. Em especial, anticorpos contra um抗ígeno, por exemplo, um抗ígeno oncofetal produzido ou associado com um tumor sólido maligno ou neoplasma hematopoiético, por exemplo, um tumor gastrointestinal, estomacal, do cólon, do esôfago, do fígado, pulmão, de mama, pancreático, fígado, próstata, ovariana, testicular, cérebro, ossos ou linfático, um sarcoma ou um melanoma são vantajosamente usados. Tais agentes terapêuticos podem ser dados uma vez ou repetidamente, dependendo no estado da doença e tolerabilidade do conjugado e também pode ser usada opcionalmente na combinação com outras modalidades terapêuticas, tais como cirurgia, radiação externa, radioimunoterapia,

imunoterapia, quimioterapia, terapia antisense, terapia por RNA de interferência, terapia de genes e semelhantes. Cada combinação será adaptada ao tipo de tumor, estágio, condição do paciente e terapia anterior e outros fatores considerados pelo médico geral.

[00173] Conforme usado no presente documento, o termo "sujeito" se refere a qualquer animal (por exemplo, vertebrados e invertebrado) incluindo, porém não se limitando, a mamíferos, incluindo humanos. Não é intenção que o termo seja limitado a uma idade ou sexo em especial. Assim, sujeitos adultos ou recém-nascidos, bem como fetos, masculinos ou femininos, são abrangidos pelo termo. As doses dadas no presente documento são para humanos, porém, pode ser ajustadas ao tamanho de outros mamíferos, bem como crianças, de acordo com o peso ou tamanho do metro cúbico.

[00174] Em uma modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos compreendendo um anticorpo anti-EGP-1 (anti-TROP-2) tal como o MAb de hRS7 podem ser usados para tratar carcinomas tal como carcinomas do esôfago, pâncreas, pulmão, estômago, cólon e reto, bexiga urinário, mamas, ovário, útero, rins e próstata, conforme divulgados na Patente U.S. Nº 7,238,785; 7,517,964 e 8,084,583, a seção de Exemplos que é incorporada no presente documento por referência. Um anticorpo hRS7 é um anticorpo humanizado que compreende sequências de região determinante de complementaridade (CDR) de cadeia leve CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:90); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:91); e CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:92) e CDR1 de sequências CDR de cadeia pesada (NYGMN, SEQ ID NO:93); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:94) e CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:95)

[00175] Em uma outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos que compreendem um anticorpo anti-CEACAM5 (por exemplo, hMN-14, labretuzumabe) e/ou um anticorpo anti-CEACAM6 (por exemplo,

hMN-3 ou hMN-15) podem ser usados para tratar qualquer variedade de câncer que expressa CEACAM5 e/ou CEACAM6, conforme divulgada na Patente U.S. N° 7.541.440; 7.951.369; 5.874.540; 6.676.924 e 8.267.865, a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por referência. Tumores sólidos que podem ser tratados usando anti-CEACAM5, anti-CEACAM6 ou uma combinação dos dois incluem, porém não se limitam a, câncer de mama, pulmão, pâncreas, esôfago, medular da tireoide, ovariano, colôn, reto, bexiga urinária, boca e estômago. A maioria dos carcinomas, incluindo gastrointestinal, respiratório, geniturinário e câncer de mama expresso CEACAM5 e pode ser tratado com os imunoconjungados do sujeito. Um anticorpo hMN-14 é um anticorpo humanizado que compreende CDR1 (KASQDVGTSVA; SEQ ID NO:96), CDR2 (WTSTRHT; SEQ ID NO:97), e CDR3 (QQYSLYRS; SEQ ID NO:98) de sequências CDR da região variável de cadeia leve e CDR1 (TYWMS; SEQ ID NO:99), CDR2 (EIHPDSSTINYAPSLKD; SEQ ID NO:100) e CDR3 (LYFGFPWFAY; SEQ ID NO:101) de sequências CDR de região variável de cadeia pesada. Um anticorpo hMN-3 é um anticorpo humanizado que compreende CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:102), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:103) e CDR3 (FQGSHVPPT, SEQ ID NO:104) de sequências CDR de região variável de cadeia leve e o CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:105), CDR2 (WINTYTGEPTYADDFKG, SEQ ID NO:106) e CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO:107) das sequências CDR de cadeia pesada. Um anticorpo hMN-15 é um anticorpo humanizado que compreende SASSRVSYIH (SEQ ID NO:108); GTSTLAS (SEQ ID NO:109); and QQWSYNPPT (SEQ ID NO:110) de sequências CDR de região variável de cadeia leve e DYYMS (SEQ ID NO:111); FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO:112); e DMGIRWNFDV (SEQ ID NO:113) de sequências CDR de cadeia pesada.

[00176] Em outra modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo um anticorpo anti-CD74 (por exemplo, hLL1, milatuzumabe,

divulgado na Patente U.S. N° 7.074.403; 7.312.318; 7.772.373; 7.919.087 e 7.931.903, a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por referência) podem ser usados para tratar variedades de câncer que expressa CD74, incluindo, porém não se limitando a, câncer renal, de pulmão, intestinal, de estômago, de mama, próstata ou ovariano, bem como diversos tipos de câncer hematológico, tais como mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin. Um anticorpo hLL1 é um anticorpo humanizado compreendendo CDR1 (RSSQLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:114), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:115), e CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:116) nas sequências CDR de cadeia leve e CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:117), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:118), e CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:119) de sequências CDR de região variável de cadeia pesada.

[00177] Em outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos compreendendo um anticorpo anti-CD22 (por exemplo, hLL2, epratuzumabe, divulgado na Patente U.S. N° 5.789.554; 6.183.744; 6.187.287; 6.306.393; 7.074.403 e 7.641.901, a seção de Exemplos incorporada no presente documento por referência, ou o anticorpo RFB4 químérico ou humanizado) pode ser usado para tratar variedades de câncer que expressam CD22, incluindo, porém não limitado a, formas indolentes de linfomas de células B, formas agressivas de linfomas de células B, leucemias linfáticas crônicas, leucemias linfáticas agudas, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma folicular ou linfoma difuso de células B. Um anticorpo hLL2 é um anticorpo humanizado compreendendo CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO:120), CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO:121), e CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO:122) de sequências CDR de cadeia leve e CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO:123), CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO:124), e CDR3 (RDITTFY,

SEQ ID NO:125) de sequências CDR de cadeia pesada

[00178] Em uma modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo anticorpos anti-CSAp, tal como hMu-9 MAb, podem ser usados para tratar câncer colorretal, bem como câncer pancreático e ovariano conforme divulgado na Patente U.S. N°. 6.962.702; 7.387.772; 7.414.121; 7.553.953; 7.641.891 e 7.670.804, a seção de Exemplos de cada um incorporada no presente documento por referência. Além disso, conjugados terapêuticos compreendendo o hPAM4 MAb podem ser usados para tratar câncer pancreático e outros tumores sólidos, conforme divulgado na Patente U.S. N° 7.238.786 e 7.282.567, a seção de Exemplos de cada um é incorporado no presente documento por referência. Um anticorpo hMu-9 é um anticorpo humanizado compreendendo as sequências CDR de cadeia leve CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:126), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:127), e CDR3 (FQGSRVPYT, SEQ ID NO:128), e sequências CDR variáveis de cadeia pesada CDR1 (EYVIT, SEQ ID NO:129), CDR2 (EIYPGSGSTSNEKFK, SEQ ID NO:130), e CDR3 (EDL, SEQ ID NO:131). Um anticorpo hPAM4 é um anticorpo humanizado compreendendo sequências CDR de região variável de cadeia leve CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:132); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:133); e CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:134); e sequências CDR de cadeia pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:135); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:136) e CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:137).

[00179] Em uma outra modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo um MAb anti-AFP, tal como IMMU31, podem ser usados para tratar carcinoma hepatocelular, tumores de células germinativas e outros tumores produtores de AFP usando formas de anticorpos humanizados, quiméricos e humanos, conforme divulgados na Patente U.S. N° 7,300,655, a seção de Exemplos de cada um está incorporada no presente documento por

referência. Um anticorpo IMMU31 é um anticorpo humanizado compreendendo as sequências CDR de cadeia pesada CDR1 (SYVIH, SEQ ID NO:138), CDR2 (YIHPYNGGTKYNEKFKG, SEQ ID NO:139) e CDR3 (SGGGDPFAY, SEQ ID NO:140) e a cadeia leve CDR1 (KASQDINKYIG, SEQ ID NO:141), CDR2 (YTSALLP, SEQ ID NO:142) e CDR3 (LQYDDLWT, SEQ ID NO:143).

[00180] Em uma outra modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo um MAb anti-HLA-DR, tal como hL243, podem ser usados para tratar linfoma, leucemia, câncer de pele, esôfago, estômago, colón, reto, pâncreas, pulmão, mama, ovário, bexiga, endométrio, colo do útero, testículos, rins, fígado, melanoma e outros tumores produtores de HLA-DR, conforme divulgados na Patente U.S. N° 7.612.180, a seção de Exemplos de cada está incorporada no presente documento por referência. Um anticorpo hL243 é um anticorpo humanizado compreendendo as sequências CDR de cadeia pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:144), CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO:145), e CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO:146) e sequências CDR de cadeia leve CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO:147), CDR2 (AASNLD, SEQ ID NO:148), e CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO:149).

[00181] Em uma outra modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo um MAb anti-CD20, tal como veltuzumabe (hA20), 1F5, obinutuzumabe (GA101), ou rituximabe, podem ser usados para tratar linfoma, leucemia, púrpura trombocitopênica imune, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren, síndrome de Evans, artrite, arterite, pênfigo vulgar, rejeição de enxerto renal, rejeição de transplante cardíaco, atrite reumatóide, linfoma de Burkitt, linfoma não Hodgkin, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeno, linfoma difuso de células B, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica crônica, leucemia linfocítica aguda, diabetes mellitus tipo I, GVHD, esclerose múltipla ou mieloma múltiplo, conforme divulgado na Patente

U.S. N° 7.435.803 ou 8.287.864, a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por referência. Um anticorpo hA20 (veltuzumabe) é um anticorpo humanizado compreendendo as sequências CDR de cadeia leve CDRL1 (RASSSVSYIH, SEQ ID NO:150), CDRL2 (ATSNLAS, SEQ ID NO:151) e CDRL3 (QQWTSNPPT, SEQ ID NO:152) e sequências CDR de cadeia pesada CDRH1 (SYNMH, SEQ ID NO:153), CDRH2 (AIYPGNGDTSYNQKFKG, SEQ ID NO:154) e CDRH3 (STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO:155).

[00182] Em outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos compreendendo um MAb anti-CD19, tal como hA19, podem ser usados para tratar linfomas e leucemias relacionadas a células B, tal como linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica ou leucemia linfoblástica aguda. Outros estados de doenças que podem ser tratados incluem doenças autoimunes, tal como a trompocitopênica imune crônica, dermatomiosite, coreia de Sydenham, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, febre reumática, síndrome poliglandular, penfigóide bolhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, doença de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeíte obliterante, síndrome de Sjögren, cirrose biliar primária, tiroïdite de Hashimoto, tireotoxicose, esclerodermia, hepatite crônica ativa, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, pênfigo vulgar, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arterite/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva, psoríase ou alveolite fribosante, conforme divulgadas na Patente U.S. N°. 7.109.304, 7.462.352, 7.902.338, 8.147.831 e 8.337.840, a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por

referência. Um anticorpo hA19 é um anticorpo humanizado compreendendo as sequências CDR de cadeia leve CDR1 KASQSVDYDGDSYLN (SEQ ID NO: 156); CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO: 157); e CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO: 158) e as sequências CDR de cadeia pesada CDR1 SYWMN (SEQ ID NO: 159); CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 160) e CDR3 RETTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO: 161).

[00183] Em outra modalidade preferencial, conjugados terapêuticos compreendendo anticorpos anti-tenascina podem ser usados para tratar tumores hematopoiéticos e sólidos, e conjugados compreendendo anticorpos para tenascina podem ser usados para tratar tumores sólidos, preferencialmente, câncer do cérebro como glioblastomas.

[00184] Em uma modalidade preferencial, os anticorpos que são usados no tratamento de doenças humanas são versão humanas ou humanizadas (CDR-enxertados) de anticorpos; apesar das versões murinas e quiméricas dos anticorpos poderem ser usadas. As moléculas IgG de mesma espécies como agentes de entrega são mais preferenciais para minimizar as respostas imunes. Isto é especialmente importante quando considerar os tratamentos repetidos. Para humanos, um anticorpo IgG humano ou humanizado é menos provável de gerar uma resposta imune anti-IgG de pacientes. Anticorpos tais como hLL1 e hLL2 internalizam rapidamente após ligação com antígeno de internalização em células alvo, o que significa que o medicamento quimioterápico sendo transportado também é rapidamente internalizado nas células. Contudo, anticorpos que possuem taxas menores de internalização também podem ser usadas para efetivar a terapia seletiva.

[00185] Em uma outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos podem ser usados contra patógenos, desde que os anticorpos contra os patógenos sejam conhecidos. Por exemplo, anticorpos e fragmentos

de anticorpos que ligam de forma específica marcadores produzidos ou associados com lesões infecciosas, incluindo infecções virias, bacterianas, por fungos e parasitárias, por exemplo, causadas por patógenos tais como bactérias, rickettsia, micoplasmas, protozoários, fungos e vírus, e antígenos e produtos associados dos quais os microorganismos foram divulgados, *inter alia*, em Hansen et al., Pat. U.S. Nº 3.927.193 e Goldenberg Pat. U.S. Nº. 4.331.647. 4.348.376. 4.361.544. 4.468.457. 4.444.744. 4.818.709 e 4.624.846, a seção de Exemplos de cada uma é incorporada neste documento por referência, e em Reichert e Dewitz, citado acima. Em uma modalidade preferencial, os patógenos são selecionados de grupos consistindo de vírus HIV, *Mycobacterium de tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Hemophilus influenzae* B, *Treponema pallidum*, espiroquetas da doença de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, vírus da raiva, vírus influenza, citomegalovírus, vírus da herpes simples tipo I, vírus da herpes simples tipo II, parvovírus de soro humano, vírus sincicial respiratório, vírus da herpes zóster, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus do sarampo, adenovírus, vírus da leucemia em célula T humana, vírus Epstein-Barr, vírus da leucemia murina, vírus da caxumba, vírus da estomatite vesicular, vírus da sindbis, vírus da coriomeningite linfocítica, vírus da verruga, vírus da língua azul, vírus Sendai, vírus da leucemia felina, reovírus, poliovírus, vírus símio 40, vírus do tumor mamário do camundongo, vírus da dengue, vírus da rubéola, vírus do Nilo Ocidental, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiensei*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma*

japonicum, Babesia bovis, Elmeria tenella, Onchocerca volvulus, Leishmania tropica, Trichinella spiralis, Theileria parva, Taenia hydatigena, Taenia ovis, Taenia saginata, Echinococcus granulosus, Mesocestoides corti, Mycoplasma arthritidis, M. hyorhinis, M. orale, M. arginini, Acholeplasma laidlawii, M. salivarium e M. pneumoniae, conforme divulgado na Patente U.S. N° 6.440.416. a seção de Exemplos de cada uma foi incorporada no presente documento por referência.

[00186] Em uma modalidade preferencial, os conjugados de medicamentos da presente invenção compreendendo anticorpos anti-gp120 e outros anticorpos tais como anti-HIV podem ser usados como agentes terapêuticos para HIV em pacientes com AIDS; e conjugados de medicamentos de anticorpos para *Mycobacterium tuberculosis* são adequados como agentes terapêuticos para tuberculose refratária por medicamento. Proteínas de fusão de MAb anti-gp120 (MAb anti HIV) e uma toxina, tal como exotocina de *Pseudomonas*, foram examinadas por propriedades antivirais (Van Oigen et al., *J Drug Target*, 5:75-91, 1998). As tentativas de tratar a infecção por HIV em pacientes com AIDS não foram bem sucedidas, possivelmente devido a eficácia insuficiente ou toxicidade inaceitável do hospedeiro. Os conjugados de medicamentos da presente invenção, de maneira vantajosa, não possuem tais efeitos colaterais tóxicos das toxinas proteicas e, portanto, são usados beneficamente no tratamento de infecção por HIV em pacientes com AIDS. Estes conjugados de medicamentos podem ser administrados sozinhos ou combinados com outros antibióticos ou agentes terapêuticos que são eficazes nos referidos pacientes quando administrados de maneira isolada. Possíveis anticorpos anti-HIV incluem o anticorpo anti-envelope P4/D10 descrito por Johansson et al. (AIDS 2006 Oct 3;20(15):1911-5), bem como os anticorpos anti-HIV descritos e vendidos pela Polymun (Viena, Áustria),

também descritos na U.S. Patent 5.831.034, U.S. Patent 5.911.989, e Vcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 e Joos et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(5):1773-9, todos incorporados no presente documento por referência. Um agente preferencial de direcionamento para HIV são várias combinações destes anticorpos a fim de suplantar a resistência.

[00187] Em uma modalidade preferencial, uma incorporação mais eficaz em células e patógenos podem ser conseguida pelo uso de anticorpos multivalentes, multiespecíficos, multivalentes ou monoespécíficos. Exemplos dos anticorpos bivalnetes e biespecíficos se encontram na Patente U.S. N° 7.387.772; 7.300.655; 7.238.785; e 7.282.567, a seção de Exemplos de cada um é incorporada no presente documento por referência. Estes anticorpos multivalentes ou multiespecíficos são especialmente preferenciais no direcionamento de tipos de câncer e organismos infecciosos (patógenos) que expressam alvos de抗ígenos múltiplos e mesmo epítópos múltiplos do mesmo抗ígeno alvo, porém, que geralmente evadem o direcionamento de anticorpos e ligações suficientes para a imunoterapia devido à expressão insuficiente ou disponibilidade de um抗ígeno alvo único na célula ou patógeno. Por direcionar抗ígenos ou epítópos múltiplos, os referidos anticorpos demonstram uma ligação e tempo de residência maior no alvo, portanto, proporcionando uma saturação maior com o medicamento sendo direcionado nesta invenção.

[00188] Em uma outra modalidade preferencial, os conjugados terapêuticos podem ser usados para tratar doenças autoimunes ou disfunção do sistema imune (por exemplo, doença enxerto contra hospedeiro, rejeição de transplante de órgãos). Anticorpos de uso para tratar doenças de disfunções autoimunes/imunes podem se ligar a抗ígenos exemplificativos, incluindo, porém não se limitando a, BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7,

CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41a, CD43, CD45, CD55, CD56, CCD57, CD59, CD64, CD71, CD74, CD79a, CD79b, CD117, CD138, FMC-7 e HLA-DR. Anticorpos que se ligam a estes e outros抗ígenos alvo, discutidos acima, podem ser usados para tratar doenças de disfunção autoimune ou imune. Doenças autoimunes que podem ser tratadas com imunoconjugados podem incluir púrpura trombocitopênica idiopática aguda, púrpura trombocitopênica idiopática crônica, dermatomiosite, coreia de Sydenham, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, febre reumática, síndrome poliglandular, penfigóide bolhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, vasculites associadas a ANCA, doenças de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeíte obliterante, síndrome de Sjogren, cirrose biliar primária, tiroidite de Hashimoto, tireotoxicose, esclerodermia, hepatite crônica ativa, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, penfigóide bolhoso, pênfigo vulgar, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arterite/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva, psoríase ou alveolite fribosante.

[00189] Em outra modalidade preferencial, um agente terapêutico usado em combinação com o conjugado de camptotecina da presente invenção pode compreender um ou mais isótopos. Isótopos radioativos úteis para tratamento de tecidos doentes incluem, porém não se limitam a, - ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr ,

⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²²⁷Th e ²¹¹Pb. O radionuclídeo terapêutico possui preferencialmente uma energia de decaimento na faixa de 20 a 6.000 keV, preferencialmente entre 60 a 200 keV para um emissor de Auger, 100-2,500 keV para um emissor beta e 4,000-6,000 keV para um emissor alfa. As energias de decaimento máximas de nuclídeos emissores de partículas beta são preferencialmente 20-5,000 keV, mais preferencialmente 100-4,000 keV, e mais preferencialmente 500-2,500 keV. Radionuclídeos que decaem significativamente com partículas emissoras de Auger também são preferenciais. Por exemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Energias de decaimento de nuclídeos emissores de partículas beta úteis são preferencialmente <1,000 keV, mais preferencialmente <100 keV, e mais preferencialmente <70 keV. Radionuclídeos que decaem significativamente com geração de partículas alfa também são preferenciais. Tais radionuclídeos incluem, porém não se limitam a: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 e Fm-255. As energias de decaimento de radionuclídeos emissores de partículas alfa úteis são preferencialmente 2.000-10.000 keV, mais preferencialmente 3.000-8.000 keV, e mais preferencialmente 4.000-7.000 keV. Radioisótopos potenciais adicionais de uso incluem ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ²²⁴Ac, ¹²⁶I, ¹³³I, ⁷⁷Br, ^{113m}In, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁹⁹Au, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, ¹⁶⁹Yb, e semelhantes.

[00190] Radionuclídeos e outros metais podem ser entregues, por exemplo, usando grupos quelantes ligados a um anticorpo ou conjugado. Quelatos macrocíclicos tais como NOTA, DOTA, e TETA são usados com uma variedade de metais e radiometais, mais preferencialmente com radionuclídeos

de gálio, ítrio e cobre, respectivamente. Tais complexos de metal-quelato podem ser feitos muito estáveis por adaptar o tamanho do anel ao metal de interesse. Outros quelatos tipo anel, tais como poliésters macrocíclicos para complexar ²²³Ra, podem ser usados.

[00191] Agentes terapêuticos de uso em combinação com conjugados de camptotecina descritos no presente documento também incluem, por exemplo, medicamentos quimioterápicos tais como alcalóides da vinca, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabólitos, inibidores de tirosina quinase, agentes de alquilação, antibióticos, inibidores Cox-2, antimitóticos, agentes antiangiogênicos e pro-apoptóticos, especialmente doxorubicina, metotrexato, taxol, outras camptotecinas e outros destes, e outras classes de agentes anticâncer e semelhantes. Outros medicamentos quimioterápicos contra câncer incluem mostardas nitrogenadas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complexos de coordenação de platina, hormônios e semelhantes. Tais agentes quimioterápicos adequados são descritos em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), e em GOODMAN e GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), bem como edições revisadas destas publicações. Outros agentes quimioterápicos adequados, tais como medicamentos experimentais, são conhecidos para os versados na técnica.

[00192] Outros medicamentos exemplificativos de uso incluem, porém não se limitam a, 5-fluorouracil, afatinibe, aplidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, axitinibe, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomibe, bosutinib, briostatina-1, busulfano, caliqueamicina, camptotecina, carboplatina, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex,

clorambucila, cisplatina (CDDP), inibidores de Cox-2, irinotecano (CPT-11), SN-38, carboplatina, cladribina, camptotecanos, crizotinibe, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, dasatinibe, dinaciclibe, docetaxel, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), ciano-morfolino doxorrubicina, doxorrubicina glucuronida, epirrubicina glucuronida, erlotinibe, estramustina, epidofillotoxina, erlotinibe, entinostate, agentes de ligação a receptor de estrógeno, etoposídeo (VP16), glucoronida de etoposídeo, fosfato de etoposídeo, exemestano, fingolimode, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inibidores de transferase farnesil-proteína, flavopiridol, fostamatinibe, ganetespibe, GDC-0834, GS-1101, gefitinibe, gemcitabina, hidroxiureia, ibrutinibe, idarrubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinibe, L-asparaginase, lapatinibe, lenolidamide, leucovorina, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, melfalana, mercaptoperúrina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbine, neratinibe, nilotinibe, nitrosurea, olaparibe, plicomicina, procarbazina, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, sorafenibe, estreptozocina, SU11248, sunitinibe, tamoxifen, temazolomide (uma forma aquosa de DTIC), transplatina, talidomida, tioguanina, tiotepa, teniposídeo, topotecano, mustarda de uracila, vatalanibe, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcalóides da vinca e ZD1839. Tais agentes podem ser parte dos conjugados descritos no presente documento ou podem ser administrados alternativamente em combinação com os agentes descritos, antes, simultaneamente ou após o conjugado. Alternativamente, um ou mais anticorpos puros terapêuticos, conforme são conhecidos na técnica, podem ser usados em combinação com os conjugados descritos. Anticorpos puros terapêuticos e exemplificativos são descritos acima.

[00193] Agentes terapêuticos que podem ser usados em harmonia

com os conjugados de camptotecina também podem compreender toxinas conjugadas a frações de direcionamento. Toxinas que podem ser usadas neste respeito incluem ricina, abrina, ribonuclease (RNase), DNase I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral pokeweed, gelonina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* e endotoxina de *Pseudomonas*. (See, e.g., Pastan. et al., *Cell* (1986), 47:641, e Sharkey e Goldenberg, *CA Cancer J Clin.* 2006 Jul-Aug;56(4):226-43.) Toxinas adicionais adequadas para uso no presente documento são conhecidas para os versados na técnica e se encontram divulgadas na U.S. 6,077,499.

[00194] Ainda outra classe de agente terapêutico pode compreender um ou mais imunomoduladores. Imunomoduladores de uso podem ser selecionados de uma citocina, um fator de crescimento de células-tronco, uma linfotoxina, um fator hematopoiético, um fator estimulador de colônias (CSF), um interferon (IFN), eritropoietina, trombopoietina e uma combinação destes. Aqueles especificamente úteis são linfotoxinas tais como fator de necrose tumoral (TNF), fatores hematopoieticos, tal como uma interleucina (IL), fator estimulador de colônias, tal como fator estimulador de colônica de granulócitos (G-CSF) ou fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interferon, tal como interferons- α , - β , - γ ou - λ , e fator de crescimento de células-tronco, tal como o nomeado "fator S1". Incluídas entre as citocinas estão os hormônios de crescimento tais como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionil e hormônio de crescimento bovino; hormônio paratireoide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormônios de glicoproteínas tais como hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH), e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; prostaglandina, fator de crescimento de fibroplastos; prolactina; lactôgeno placentário, proteína OB;

fator de necrose tumoral alfa e beta; substância inibidora mulleriana; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervos tais como NGF- β ; fator de crescimento de plaquetas; fator de transformação de crescimento (TGFs) tal como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento semelhante à insulina-I e -II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons tais como interferon- α , - β , e - γ ; fatores estimuladores de colônias (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit ligante ou FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, fator de necrose tumoral e linfotoxina (LT). Conforme usado no presente documento, o termo citoxinas inclui proteínas de fontes naturais ou de culturas celulares recombinantes e equivalentes biologicamente ativos de citocinas de sequências nativas.

[00195] Quimiocinas de uso incluem RANTES, MCAF, MIP1-alpha, MIP1-Beta e IP-10.

[00196] A pessoa versada na técnica perceberá que os imunoconjungados do sujeito, compreendendo uma camptotecina conjugada a um anticorpo ou fragmento de anticorpo, podem ser usados sozinhos ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos, tais como segundo anticorpo, segundo fragmento de anticorpo, segundo imunoconjungado, radionuclídeo, toxina, medicamento, agente quimioterápico, terapia por radiação, quimiocina, citocina, imunomodulador, enzima, hormônio, oligonucleotídeo, RNAi ou siRNA. Tais agentes terapêuticos adicionais podem ser administrados separadamente, em combinação, ou ligados aos imunoconjungados anticorpo-droga do sujeito.

Formulação e Administração

[00197] Vias adequadas de administração dos conjugados incluem, sem limitação, injeções orais, parenterais, subcutâneas, retais, transmucosa, administração intestinal, intramuscular, intramedular, intratecal, intraventricular direta, intravenosa, intravítreia, intraperitoneal, intranasal ou injeções intraoculares. As vias preferenciais de administração são as parenterais. Alternativamente, alguém pode administrar o composto em um local em vez de forma sistêmica, por exemplo, através da injeção do composto diretamente em um tumor sólido.

[00198] Imunoconjugados podem ser formulados de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmaceuticamente úteis, segundo o qual o imunoconjugado é combinado em uma mistura com um excipiente farmaceuticamente aceitável. Solução salina estéril tamponada com fosfato é um exemplo de um excipiente farmaceuticamente aceitável. Outros excipientes adequados são bem conhecidos para os versados na técnica. Vide, por exemplo, Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS e DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), e Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), e edições revisadas destes.

[00199] Em uma modalidade preferencial, o imunoconjugado é formulado em tampão biológico de Good (pH 6-7), usando um tampão selecionado do grupo consistindo de N-(2-acetamido)-2-ácido aminoetanosulfônico (ACES); N-(2-acetamido)ácido iminodiacético (ADA); N,N-bis(2-hidroxietil)-2-ácido aminoetanosulfônico (BES); 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-ácido etanosulfônico (HEPES); 2-(N-morfolino)ácido etanosulfônico (MES); 3-(N-morfolino)ácido propanosulfônico (MOPS); 3-(N-morfolinil)-2-ácido hidroxipropanosulfônico (MOPSO); e piperazina-N,N'-bis(2-

ácido etanosulfônico) [Pipes]. Tampões mais preferenciais são MES ou MOPS, preferencialmente na faixa de concentração de 20 a 100 mM, mais preferencialmente cerca de 25 mM. Mais preferencialmente é 25 mM MES, pH 6,5. A fórmula pode compreender adicionalmente 25 mM trealose e 0,01% v/v polisorbato 80 como excipientes, com a concentração do tampão final modificada para 22,25 mM em resultado dos excipientes adicionados. O método preferencial de armazenamento é como uma fórmula liofilizada dos conjugados, armazenada na faixa de temperatura de -20 °C a 2 °C, com a armazenagem mais preferencial de 2 °C a 8 °C.

[00200] O imunoconjugado pode ser formulado por administração intravenosa através de, por exemplo, injeção em bolus, infusão lenta ou infusão contínua. Preferencialmente, o anticorpo da presente invenção é infundido durante um período menor que 4 horas e mais preferencialmente durante um período menor que cerca de 3 horas. Por exemplo, as primeiras 25-50 mg poderiam ser infundidas dentro de 30 minutos, preferencialmente, em 15 min, e o restante infundido durante as próximas 2-3 horas. As formulações para injeção podem ser apresentadas sob forma de dosagem de unidade, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas, com um conservante adicionado. As composições podem tomar essas formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formulatórios, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou de dispersão. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para a constituição antes do uso com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirogênio.

[00201] Métodos farmacêuticos adicionais podem ser empregados para controlar a duração da ação dos conjugados terapêuticos. Preparações com liberação controlada podem ser formuladas através do uso de polímeros

para complexar ou absorver o imunoconjugado. Por exemplo, polímeros biocompatíveis incluem matrizes de poli(etileno-co-vinil acetato) e matrizes de copolímero de polianidrido de um dímero de ácido esteárico e ácido sebácico. Sherwood *et al.*, *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). A taxa de liberação de um imunoconjugado da referida matriz depende do peso molecular do imunoconjugado, da quantidade de imunoconjugados dentro da matriz e do tamanho das partículas dispersadas. Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Outras formas de dosagem sólida estão descritas em Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS e DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), e Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), e edições revisadas destes.

[00202] Geralmente, a dosagem de um imunoconjugado administrado para humanos irá variar dependendo dos referidos fatores como a idade do paciente, peso, altura, sexo, condição médica geral e histórico médico anterior. Pode ser desejável fornecer o recipiente com uma dosagem de imunoconjugado que se encontra dentro da faixa de cerca de 1 mg/kg a 24 mg/kg como uma infusão intravenosa única, apesar de uma dosagem inferior ou superior também ser administrada como circunstâncias prescritas. Uma dosagem de 1-20 mg/kg para um paciente com 70 kg, por exemplo, é de 70-1,400 mg, ou 41-824 mg/m² para um paciente com 1,7-m. A dosagem pode ser repetida conforme necessário, por exemplo, um vez por semana ao longo de 4-10 semanas, uma vez por semana ao longo de 8 semanas ou uma vez por semana ao longo de 4 semanas. Também pode ser dada com menos frequência, tal como por algumas semanas ao longo de vários meses ou mensalmente ou trimestralmente por muitos meses, conforme necessário em uma terapia de manutenção. Dosagens preferenciais podem incluir, porém não

se limitam a, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg e 24 mg/kg. Qualquer quantidade na faixa de 1 a 24 mg/kg pode ser usada. A dosagem é preferencialmente administrada múltiplas vezes, uma vez ou duas vezes na semana. Pode-se usar um cronograma de dosagem mínima de 4 semanas, mais preferencialmente 8 semanas, mais preferencialmente 16 semanas ou mais longo. O cronograma de administração podem compreender administração uma vez ou duas vezes na semana, em um ciclo selecionado do grupo consistindo de: (i) semanalmente; (ii) em algumas semanas; (iii) uma semana de terapia seguida por duas, três ou quatro semanas sem terapia; (iv) duas semanas de terapia seguidas por uma, duas, três ou quatro semanas sem terapia; (v) três semanas de terapia seguidas por uma, duas, três, quatro ou cinco semanas sem terapia ; (vi) quatro semanas de terapia seguidas por uma, duas, três, quatro ou cinco semanas sem terapia; (vii) cinco semanas de terapia seguidas por uma, duas, três, quatro ou cinco semanas sem terapia; e (viii) mensalmente. O ciclo pode ser repetido 4, 6, 8, 10, 12, 16 ou 20 vezes ou mais.

[00203] Alternativamente, um imunoconjugado pode ser administrado como um dosagem a cada 2 ou 3 semanas, repetido para um total de pelo menos 3 dosagens. Ou, duas vezes por semana por 4-6 semanas. Caso a dosagem for rebaixada para 200-300 mg/m² (340 mg por dosagem para um paciente com 1,7-m, ou 4,9 mg/kg para um paciente com 70 kg), pode ser administrado uma vez ou mesmo duas vezes na semana por 4 a 10 semanas. Alternativamente, o cronograma de dosagem pode ser diminuído, ou seja, a cada 2 ou 3 semanas por 2-3 meses. Foi determinado que, contudo, mesmo dosagens maiores, tais como 12 mg/kg uma vez na semana ou uma vez a cada

2-3 pode ser administrada por infusão intravenosa lenta por meio de ciclos de dosagens repetidos. O cronograma de dosagem pode ser opcionalmente repetido em outros intervalos e a dosagem pode ser dada através de várias vias parenterais com ajuste adequado da dose e cronograma.

[00204] Em modalidades preferenciais, os imunoconjugados são de uso para terapia de câncer. Os exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, glioblastoma, blastoma, sarcoma e leucemia, mieloma ou enfermidades linfoides malignas. Exemplos mais específicos de tais cânceres são observados abaixo e incluem o câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células epiteliais escamosas), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, câncer de pulmão incluindo câncer de pequenas células do pulmão, câncer de pulmão de células não-pequenas, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão, câncer de peritônio, câncer gástrico ou estomacal incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma multiforme, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer da bexiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendócrinos, câncer de tireoide medular, carcinoma de tireoide diferenciado, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer do reto, câncer endometrial ou carcinoma uterino, carcinoma de glândulas salivares, câncer de rins ou câncer renal, câncer de próstata, câncer vulvar, carcinoma anal, carcinoma de pênis, assim como câncer de cabeça e pescoço. O termo "câncer" inclui células ou tumores malignos primários (por exemplo, aqueles em que as células não migraram para sítios no corpo do sujeito, exceto o sítio da malignidade ou tumor original) e células ou tumores malígnos secundários (por exemplo, aqueles decorrentes de metástase, a migração de células malígnas ou células tumorais para sítios secundários que são diferentes do sítio do tumor original).

[00205] Outros exemplo de câncer ou malignidades incluem, porém não se limitam a: Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância, Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Linfocítica Aguda, Leucemia Mielóide Aguda, Carcinoma Adrenocortical, Câncer Hepatocelular em Adultos (Primário), Câncer de Fígado em Adultos (Primário), Leucemia Linfocítica Aguda em Adultos, Leucemia Mielóid Aguda em Adultos, Linfoma de Hodgkin em Adultos, Leucemia Linfocítica em Adultos, Linfoma não Hodgkin em Adultos, Câncer de Fígado Primário em Adultos, Sarcoma de Tecido Mole em Adultos, Linfoma relacionado a AIDS, Malignidades relativas a AIDS, Câncer Anal, Astrocitoma, Câncer do Duto Biliar, Câncer de Bexiga, Câncer dos Ossos, Glioma do Tronco Cerebral, Tumores Cerebrais, Câncer de Mama, Câncer da Pélvis Renal e Uretra, Linfoma do Sistema Nervoso Central (Primário), Linfoma do Sistema Nervoso Central, Astrocitoma do Cerebelo, Astrocitoma Cerebral, Câncer Cervical, Câncer Hepatocelular (Primário) na Infância, Câncer de Fígado (Primário) na Infância, Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância, Leucemia Mielóide Aguda na Infância, Glioma do Tronco Cerebral na Infância, Astrocitoma do Cerebro na Infância, Astrocitoma Cerebral na Infância, Tumores de Células Germinativas Extracraniais na Infância, Doença de Hodgkin na Infância, Linfoma de Hodgkin na Infância, Glioma do Caminho do Hipotálamo ou Visual na Infância, Leucemia Linfoblástica na Infância, Meduloblastoma na Infância, Linfoma Não Hodgkin na Infância, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Pineais e Supratentoriais, Câncer de Fígado Primário na Infância, Rabdomiossarcoma na Infância, Sarcoma de Tecido Mole na Infância, Glioma do Hipotálamo e Caminho Visual na Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica, Câncer de Colón, Linfoma Cutâneo de Células T, Carcinoma Celular de Ilhotas Pancreáticas Endócrinas, Câncer Endometrial, Ependimoma, Câncer Epitelial, Câncer do Esôfago, Sarcoma de Ewing e Tumores Relacionados, Câncer do

Pâncreas Exócrino, Tumor de Células Germinativas Extracranial, Tumor de Células Germinativas Extragonadal, Câncer do Duto Biliar Extrahepático, Câncer dos Olhos, Câncer de Mamas Feminino, Doença de Gaucher, Câncer da Vesícula Biliar, Câncer Gástrico, Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Tumores Gastrointestinais, Tumores de Células Germinativas, Tumores Trofoblásticos Gestacionais, Leucemia de Células Pilosas, Câncer de Pescoço e Cabeça, Câncer Hepatocelular, Linfoma de Hodgkin, Hipergamaglobulinemia, Câncer da Hipofaringe, Câncer Intestinal, Melanoma Intracelular, Carcinoma das Ilhotas Celulares, Câncer Pancreático de Ilhotas Celulares, Sarcoma de Kaposi, Câncer dos Rins, Câncer da Laringe, Câncer dos Lábios e Cavidade Oral, Câncer do Fígado, Câncer de Pulmão, Disordens Linfoproliferativas, Macroglobulinemia, Câncer de Mama Masculino, Mesotelioma Maligno, Timoma Maligno, Meduloblastoma, Melanoma, Mesotelioma, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático Primário Oculto, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático Primário, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático, Mieloma Múltiplo, Mieloma Múltiplo/Neoplasma de Células Plasmáticas, Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide, Desordens Mieloproliferativas, Câncer da Cavidade Nasal e Seios Paranasais, Câncer da Nasofaringe, Neuroblastoma, Linfoma Não Hodgkin, Câncer de Pele Não Melanoma, Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático Primário Oculto, Câncer da Oorfaringe, Sarcoma Fibroso Maligno/Sarcoma dos Ossos, Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno, Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno dos Ossos, Câncer Epitelial Ovariano, Câncer de Células Germinativas Ovariano, Tumor Potencialmente Maligno do Ovário, Câncer Pancreático, Paraproteinemias, Policitemia vera, Câncer da Paratireóide, Câncer do Pênis, Feocromocitoma, Tumor Pituitário, Linfoma do Sistema Nervoso Central Primário, Câncer de Fígado Primário,

Câncer de Próstata, Câncer do Reto, Câncer de Células Renais, Câncer da Pelve Renal e Uretra, Retinoblastoma, Rabdomiosarcoma, Câncer da Glândula Salivar, Sarcomas de Sarcoidose, Síndrome de Sézary, Câncer de Pele, Câncer de Pulmão de Células Pequenas, Câncer do Intestino Delgado, Sarcoma de Tecido Mole, Câncer de PESCOÇO Escamoso, Câncer do Estômago, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriais e Pineais, Linfoma de células T, Câncer do Testículo, Timoma, Câncer de Tireóide, Câncer de Células Transicionais da Pelve Renal e Uretra, Câncer Transicional da Pelve Renal e Uretra, Tumores Trofoblásticos, Câncer de Células da Uretra e Pelve Renal, Câncer da Uretra, Câncer Uterino, Sarcoma Uterino, Câncer Vaginal, Glioma do Hipotálamo e Caminho Visual, Câncer Vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms, e qualquer outra doença hiperproliferativa, além de neoplasia, localizada em um sistema orgânica listado acima.

[00206] Os métodos e composições descritos e reivindicados no presente documento podem ser usados para tratar condições malignas ou pré-malignas e para prevenir a progressão para um estado neoplásico ou maligno, incluindo, porém não se limitando, aos distúrbios descritos acima. Tais usos são indicados em condições conhecidas ou suspeitas da progressão precedente para neoplasia ou câncer, em especial, onde o crescimento de células não neoplásicas de hiperplasia, metaplasia, e mais especialmente, displasia tenha ocorrido (para revisão de tais condições anormais de crescimento, veja Robbins e Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976)).

[00207] Frequentemente, a displasia é um precursor de câncer e é principalmente encontrada no epitélio. É a forma mais desordenada de crescimento celular não neoplásico, envolvendo um perda na uniformidade celular individual e na orientação arquitetônica das células. A displasia ocorre

caracteristicamente onde existe irritação ou inflamação crônica. Desordens displásicas que podem ser tratadas incluem, porém não se limitam a, displasia ectodérmica anidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraniana, displasia ectodérmica congênita, displasia craniodiafisária, displasia craniocarpotarsal, displasia craniometafisária, displasia dentinária, displasia diafisiária, displasia ectodérmica, displasia do esmalte, displasia encéfalo-oftalmica, displasia epifisária hemimélica, displasia hepifisária múltipla, displasia epifisária punctata, displasia epitelial, displasia faciodigitogenital, displasia fibrosa familiar do maxilar, displasia branca familiar, displasia fibromuscular, displasia fibrosa dos ossos, displasia óssea florida, displasia renal-retinal hereditária, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopênica, displasia mamária, displasia mandibulofacial, displasia metafisiária, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisária múltipla, displasia óculo-aurículo-vertebral, displasia óculo-dento-digital, displasia óculo-vertebral, displasia odontogênica, displasia oftalmo-mandibulomélica, displasia cementária periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia epondiloepifisária pseudocondroplásica, displasia retinal, displasia septo-óptica, displasia espondiloepifisária e displasia ventriculorradial.

[00208] Desordens pré-neoplásicas adicionais que podem ser tratadas incluem, porém não se limitam a, desordem não proliferativa benigna (por exemplo, tumores benignos, condições fibrocísticas, hipertrofia de tecidos, pólipos intestinais ou adenomas e displasia do esôfago), leucoplasia, queratores, doença de Bowen, Pele de Fazendeiro, queilite solar e queratose solar.

[00209] Em modalidades preferenciais, o método da invenção é usado para inibir o crescimento, progressão e/ou metástase de tipos de câncer, em especial, os alistados acima.

[00210] Doenças, desordens e/ou condições hiperproliferativas adicionais incluem, porém não se limitam a, progressão, e/ou metástase de malignidades e ou desordens relacionadas, tais como leucemia (incluindo leucemias agudas; por exemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda [incluindo leucemia mieoloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia]) e leucemias crônicas (por exemplo, leucemia mielocítica crônica [granulocítica] e leucemia linfocítica crônica), policitemia vera, linfomas (por exemplo, doença de Hodgkin e doença não Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, doença da cadeia pesada, e tumores sólidos, incluindo, porém não se limitando a, sarcomas e carcinomas tais como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma de pulmão de células pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma do acústico,

oligodendrolioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

[00211] Doenças autoimunes que podem ser tratadas com imunoconjugados podem incluir trombocitopênica crônica, dermatomiosite, coreia de Sydenham, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, febre reumática, síndrome poliglandular, penfigóide bolhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, vasculites associadas a ANCA, doenças de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiite obliterante, síndrome de Sjogren, cirrose biliar primária, tiroidite de Hashimoto, tireotoxicose, esclerodermia, hepatite crônica ativa, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, penfigóide bolhoso, pênfigo vulgar, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arterite/polimialgia de células gigantes, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva, psoríase ou alveolite fribosante.

Kits

[00212] Várias modalidades podem dizer respeito a kits que contém componentes adequados para tratamentos de tecido doente em um paciente. Kits exemplificativos podem contém pelo menos um anticorpo conjugado ou outra fração de direcionamento conforme descrita no presente documento. Se a composição contendo componentes para administração não for formulada para entrega através de canal alimentar, tal como por entrega oral, um dispositivo capaz de entregar os componentes do kit através de alguma outra rota pode ser incluído. Um tipo de dispositivo, para aplicações tais como entrega parenteral, é uma siringa que é usada para injetar a composição no corpo de um sujeito. Dispositivos de inalação também podem ser usados.

[00213] Componentes de kit podem ser embalados juntos ou separados em dois ou mais recipientes. Em algumas modalidades, os recipientes podem ser frascos que contém fórmulas estéreis e liofilizadas de uma composição que é adequada para reconstituição. Um kit também pode conter um ou mais tampões adequados para reconstituição e/ou diluição de outros reagentes. Outros recipientes que podem ser usados incluem, porém não se limitam a, uma bolsa, bandeja, caixa, tubo ou semelhantes. Componentes de kits podem ser embalados e mantidos estéreis dentro dos componentes. Outros componentes que podem ser incluídos são instruções para a pessoa que usará o kit para seu benefício.

EXEMPLOS

[00214] Várias modalidades da presente invenção são ilustradas pelos seguintes exemplos, sem limitação do escopo destas.

Geral

[00215] As abreviações usadas abaixo são: DCC, diciclohexilcarbodiimida; NHS, N-hidroxisuccinimida, DMAP, 4-dimetilaminopiridina; EEDQ, 2-etóxi-1-etóxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; MMT, monometoxitritil; PABOH, *p*-aminobenzil álcool; PEG, polietilenoglicol; SMCC, succinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato; TBAF, fluoreto de tetrabutilamônio; TBDMS, cloreto de *tert*-butildimetilsilil.

[00216] Cloroformatos de compontos de hidróxi nos exemplos a seguir foram preparados usando trifosgeno e DMAP de acordo com o procedimento descrito em Moon et al. (J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008). Testes adicionais extractivos se referem a extração de clorofórmio, diclorometano ou etil-acetato e lavagem opcional com bicarbonato saturado, água e com cloreto de sódio saturado. A cromatografia flash foi feita usando sílica gel em malha 230-400 e gradientes de metanol-diclorometano usando até

15% v/v metanol-diclorometano, exceto se declarado de outra forma. HPLC de fase reversa foi realizada pelo Método A usando uma coluna de HPLC C18 7,8 × 300 mm, equipada com um filtro de pré-coluna e usando um gradiente de solvente de 100% de solvente A para 100% de solvente B em 10 minutos a uma vazão de 3 mL por minuto e mantendo 100% de solvente B a uma vazão de 4,5 mL por minuto por 5 ou 10 minutos; ou pelo Método B usando um Xbridge C18 de 4,6×30 mm, 2,5 µm, coluna, equipada com um filtro de pré-coluna, usado o gradiente de solvente de 100% de solvente A para 100% de solvente B a uma vazão de 1,5 mL por minutos por 4 min e 100 % de solvente B a uma vazão de 2 mL por minutos por 1 minuto. O solvente A foi acetato de amônio aquoso a 0,3%, pH de 4,46 enquanto o solvente B foi acetato de amônio aquoso em acetronitrila 9:1 (0,3%), pH 4,46. HPLC foi monitorada por um detector de absorbância em linha duplo configurado a 360 nm e 254 nm.

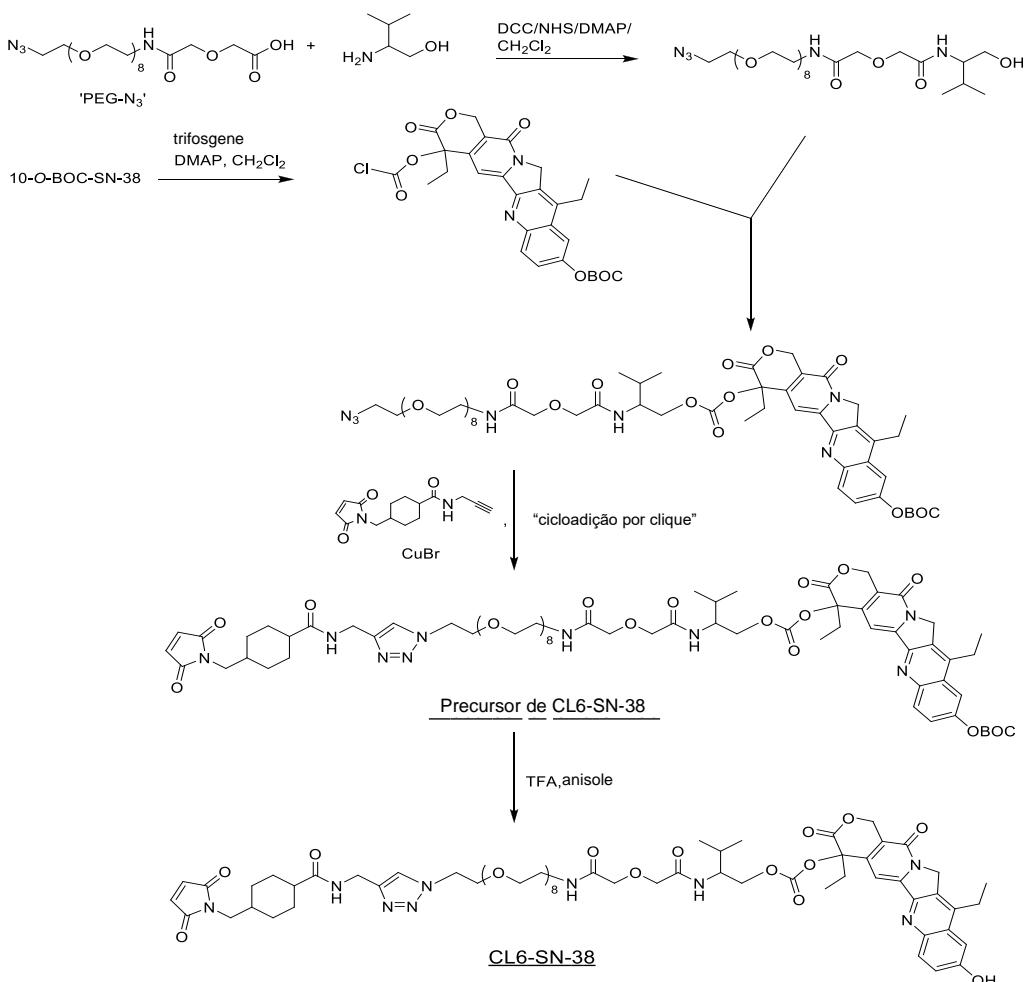
Exemplo 1. Preparação de CL6-SN-38

[00217] CL6-SN-38 é representado no Esquema-1. O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetileneglicol ('PEG-N₃'; 227 mg) foi ativada com DCC (100 mg), NHS (56 mg), e uma quantidade catalítica de DMAP em 10 mL de diclorometano por 10 min. Foi adicionado a esta mistura L-valinol (46.3 mg), e a mistura da reação foi agitada por 1 h em temperatura ambiente. Filtração seguida por remoção do solvente e cromatografia flash resultou em 214 mg do material oleoso claro. Este intermediário (160 mg) foi reagido com 10-O-BOC-SN-38-20-O-cloroformato, o último gerado a partir de 10-O-BOC-SN-38 (123 mg) usando trifosgeno DMAP. A reação de acoplamento foi feita em 4mL de diclorometano por 10 min e a mistura da reação foi purificada por cromatografia flash para obter 130 mg (45% de rendimento) do produto como material espumoso. HPLC: t_R 11.80 min; espectrometria de massas com ionização por eletrospray: M+Na: m/z 1181.

[00218] O reagente acetilênico contendo maleimida, ou seja, 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida, requerida para a cicloadição de click foi preparada pela reação de 0,107 g de SMCC e 0.021 mL de propargilamina (0,018 g; 1,01 equiv.) em diclorometano usando 1,1 equiv. de diisopropiletilamina. Após 1h, o solvente foi removido e o produto foi purificado por cromatografia flash para obter 83 mg do produto (pó incolor). A espectrometria de massas com ionização por electrospray mostrou picos em m/e 275 ($M+H$) e um pico básico em m/e 192 no modo iônico positivo, consistente com a estrutura calculada para $C_{15}H_{18}N_2O_3$: 275.1390 ($M+H$), encontrado: 275.1394 (massa exata).

[00219] O intermediário de azida (126 mg) foi dissolvido em DMSO (1,5 mL) e água (0,4 mL), e reagido com 60 mg de 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboximida e 15 mg de brometo cúprico e agitado por 30 min em temperatura ambiente. A cromatografia flash, após teste adicional da mistura da reação, forneceu 116 mg (75% rendimento) do produto de cicloadição. HPLC: t_R 11.20 min; espetrometria de massas com ionização por eletrospray: $M+H$ e $M+Na$ em m/z 1433 e 1456, respectivamente. Finalmente, desproteção com uma mistura de TFA (5 mL), diclorometano (1 mL), anisol (0.1 mL) e água (0,05 mL), seguido por precipitação com éter e cromatografia flash subsequente resultou no produto, CL6-SN-38, como um material em colante. HPLC: t_R 9,98 min; espectrometria de massas por ionização com eletrospray: $M+H$ e $M-H$ (modo iônico negativo) em m/z 1333 e 1356, respectivamente.

Esquema-1



Exemplo 2. Preparação de CL7-SN-38

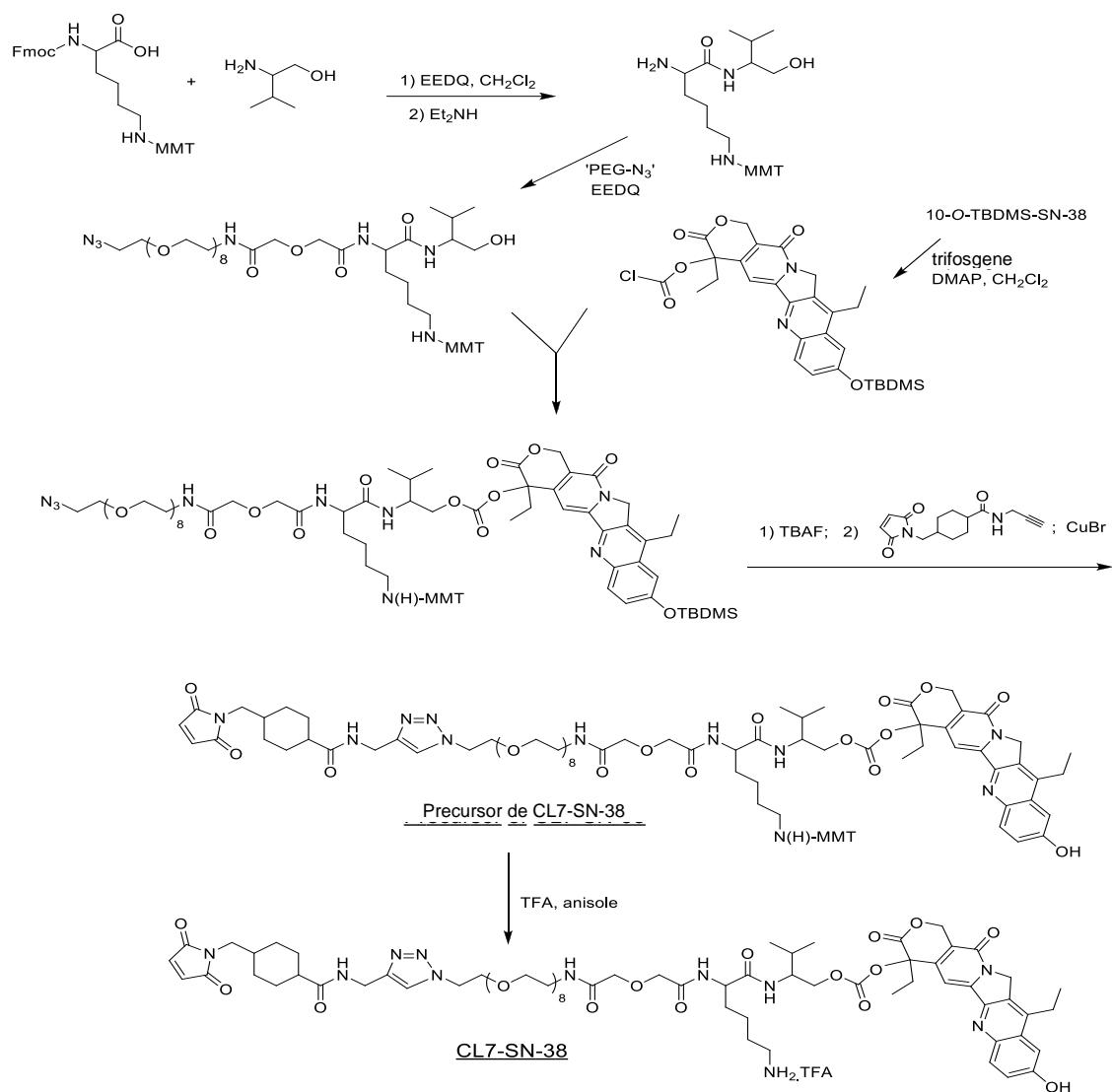
[00220] A síntese é esquematicamente mostrada no Esquema-2. L-Valinol (40 mg) foi reagido com Fmoc-Lys(MMT)-OH (253 mg) e EEDQ (107 mg) comercialmente disponíveis em 10 mL de diclorometano anidro em temperatura ambiente, por 3 h. Teste adicional extractivo seguido por cromatografia flash forneceu o produto Fmoc-Lys(MMT)-valinol como um líquido amarelo pálido (200 mg; ~ 70% rendimento). HPLC: t_R 14,38 min; espectrometria de massas por ionização com eletrospray: M+H: m/z 727. Este intermediário (200 mg) foi desprotegido com dietilamina(10 mL), e o produto (135 mg) foi obtido em ~ 90% de pureza após cromatografia flash. HPLC: t_R 10,91 min; espectrometria de massas por ionização com eletrospray: M+Na at m/z 527. Este produto (135 mg) foi acoplado com O-(2-azidoetil)-O'-(N-

diglicolil-2-aminoetil)heptaeteneglicol ('PEG-N₃'; 150 mg, 1,1 equiv.) comercialmente disponível na presença de EEDQ (72 mg, 1,1 equiv.) em 10 mL de diclorometano e agitado durante à noite em temperatura ambiente. O material bruto foi purificado por cromatografia flash para obter 240 mg do produto purificado como um óleo amarelo claro (~ 87% rendimento). HPLC: *t*_R 11,55 min; espetrometria de massas com ionização por eletrospray: M+H e M+Na em m/z 1041 em 1063, respectivamente.

[00221] Este intermediário (240 mg) foi reagido com 10-*O*-TBDMS-SN-38-20-*O*-cloroformato, o último gerado a partir de 10-*O*-TBDMS-SN-38 (122 mg) usando trifosgeno e DMAP. A reação de acoplamento foi feita em 5 mL de diclorometano por 10 min e a mistura da reação foi purificada por cromatografia flash para obter 327 mg do produto como uma espuma amarelo pálida. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray: M+H em m/z 1574. O produto inteiro foi reagido com 0,25 mmol de TBAF em 10 mL de diclorometano por 5 min e a mistura da reação foi diluída em 100 mL e lavada com salmoura.

[00222] O produto bruto (250 mg) foi dissolvido em DMSO (2 mL) e água (0,4 mL) e reagido com 114 mg of 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboximida (preparada conforme descrito no Exemplo 1) e 30 mg de brometo cúprico e agitado por 1 h em temperatura ambiente. Cromatografia flash forneceu 150 mg do penúltimo intermediário. Finalmente, a desproteção do grupo MMT com uma mistura de TFA (0,5 mL) e anisol (0,05 mL) em diclorometano (5 mL) por 3 min, seguido por purificação por cromatografia flash rendeu 69 mg de CL7-SN-38 como um material colante. HPLC: *t*_R 9,60 min; espetrometria de massas por ionização com eletrospray: M+H e M-H (modo iônico negativo) em m/z 1461 e 1459, respectivamente.

Esquema-2



Exemplo 3. Preparação de CL6-SN-38-10-O-CO₂Et

[00223] O CL6-SN-38 do Exemplo 1 (55.4 mg) foi dissolvido em diclorometano (5 mL), e regido com etilcloroformato (13,1 mg; 11,5 μ L) e diisopropiletilamina (52,5 mg; 71 μ L), e agitado por 20 min sob argônio. A mistura da reação foi diluída com 100 mL de diclorometano e lavada com 100 mL cada de 0,1 M HCl, bicarbonato de sódio meio-saturado e salmoura e seco. Cromatografia flash, após remoção do solvente, forneceu 59 mg do produto do título. HPLC: t_R 10,74 min; massa exata: calc. 1404.6457 (M+H) e 1426.6276 (M+Na); encontrado: 1404.6464 (M+H) e 1426.6288 (M+Na).

Exemplo 4. Preparação de CL7-SN-38-10-O-CO₂Et

[00224] O precursor de CL7-SN-38 do Exemplo 2 (80 mg) foi

convertido para 10-*O*-cloroformato usando o procedimento e purificação conforme descritos no Exemplo 3. Rendimento: 60 mg. HPLC: t_R 12,32 min; espetrometria de massas com ionização por eletrospray: M+H e M-H (modo iônico negativo) em m/z 1806 e 1804, respectivamente. A desproteção deste material usando ácido dicloroacético e anisol em diclorometano forneceu o produto do título. HPLC: t_R 10,37 min; espectrometria de massas por ionização com eletrospray: M+H em m/z 1534.

Exemplo 5. Preparações de CL6-SN-38-10-*O*- COR e CL7-SN-38-10-*O*- COR

[00225] Este exemplo mostra que o grupo 10-OH de SN-38 está protegido como um carbonato ou um éster, em vez como de 'BOC', de modo que o o produto final esteja pronto para conjugação dos anticorpos sem precisar desproteger o grupo de proteção 10-OH. Esse grupo é prontamente desprotegido sob condições fisiológicas de pH após adiministração in vivo da proteína conjugado. Nesses conjugados, o 'R' pode ser um alquil substituído, como $(CH_2)_n-N(CH_3)_2$, onde n é 2–10, ou um alquil, como $(CH_2)_n-CH_3$, onde n é 0–10, ou ele pode estar em uma meação de alcóxi, como " $CH_3-(CH_2)_n-O-$ ", onde n é 0–10, ou uma meação de alcóxi substituído, como $O-(CH_2)_{10-n}-N(CH_3)_2$, onde n é 2–10 e em que o grupo amino terminal encontra-se opcionalmente na forma de um sal quaternário para uma solubilidade aquosa potencializada, ou " $R_1O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-O-$ ", onde R_1 é etil ou metil e n é um inteiro com valores de 0–10. Na versão mais simples da última categoria, R = " $-(CH_2)_2-OCH_3$ ". Estes derivados de 10-hidróxi são prontamente preparados por tratamento com cloroformato do reagente escolhido, caso o derivativo final for um carbonato. Tipicamente, a camptotecina contendo 10-hidróxi, como SN-38, é tratada com um equivalente molar de cloroformato em dimetilformamida usando trietilamina como base. Sob essas condições, a posição 20-OH não é

afetada. Para formar 10-*O*-ésteres, o cloreto ácido do regente escolhido é usado. Essas derivações são convenientemente realizadas utilizando-se intermediários avançados conforme ilustrado pelos carbonatos de etila dos exemplos 3 e 4.

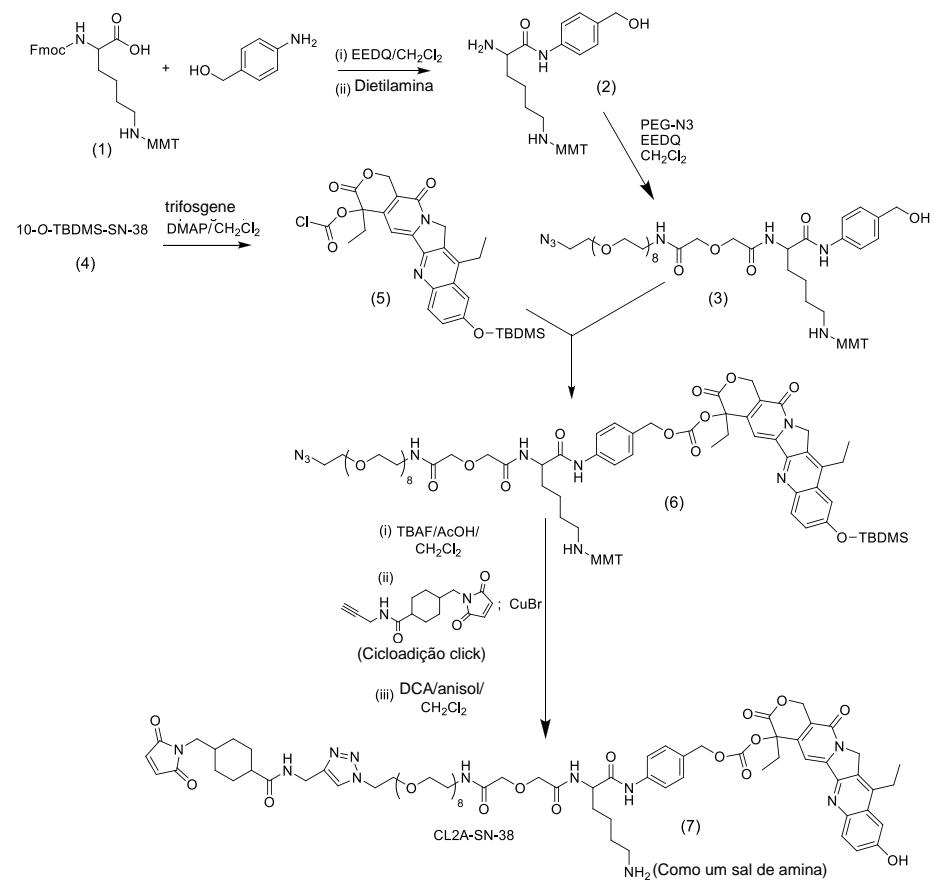
Exemplo 6. Preparação de CL2A-SN-38

[00226] À mistura de Fmoc-Lys(MMT)-OH (0.943g), *p*-álcool de aminobenzil (0.190g) no cloreto de metileno (10 mL) foi adicionado EEDQ (0.382g) a uma temperatura ambiente e agitada durante 4 h. O trabalho de extração seguido por cromatografia em flash rendeu 1.051 g de material como espuma branca. Todas as análises de HPLC foram executadas pelo método B, conforme indicado em "Geral" na seção 0148. Tempo de ret. de HPLC: 3.53 min., o espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 745.8 (M+H) e a m/e 780.3 (M+Cl⁻), consistente com a estrutura. Este intermediário (0.93 g) foi dissolvido em dietilamina (10 mL) e agitado durante 2 h. Após a remoção solvente, o resíduo foi lavado no hexano para obter 0.6 g do intermediário ((2) no esquema-3) como o precipitado incolor (91.6% puros por HPLC). Tempo de ret. de HPLC: 2.06 min. O espectro de massa de eletrospray mostrou picos em m/e 523.8 (M+H), m/e 546.2 (M+Na) e m/e 522.5 (M-H).

[00227] Este intermediário bruto (0.565g) foi acoplado com O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetileneglicol disponível comercialmente ('PEG-N3', 0.627g) usando EEDQ em cloreto de metileno (10 mL). A remoção do solvente e a cromatografia em flash renderam 0.99 g do produto ((3) no esquema-3; óleo amarelo-claro; rendimento de 87%). Tempo de ret. de HPLC: 2.45 min., o espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1061.3 (M+H), m/e 1082.7 (M+Na) e m/e 1058.8 (M-H), consistente com a estrutura. Este intermediário (0.92 g) foi reagido com os 10-*O*-TBDMS-SN-38-20-*O*-cloroformato ((5) no esquema-3) no cloreto de metileno

(10 mL) por 10 minutos sob argônio. A mistura foi purificada por cromatografia em flash para obter 0.944g como óleo amarelo-claro ((6) no esquema-3; rendimento = 68%). Tempo de ret. de HPLC: 4.18 min. A esse intermediário (0.94 g) no cloreto de metileno (10 mL) foi adicionado a mistura de TBAF (1M em THF, 0.885 mL) e de ácido acético (0.085 mL) no cloreto de metileno (3 mL), agitado então durante 10 minutos. A mistura foi diluída com o cloreto de metileno (100 mL), lavada com citrato de sódio de 0.25 M e salmoura. A remoção do solvente rendeu 0.835g de produto oleoso amarelo. Tempo de ret. de HPLC : 2.80 min., (pureza de 99%). O espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1478 (M+H), m/e 1500.6 (M+Na), m/e 1476.5 (M-H), m/e 1590.5 (M+TFA), consistente com a estrutura.

Esquema-3: Preparação de CL2A-SN-38



[00228] Esse intermediário SN-38 azido-derivado (0.803g) foi reagido com 4- (N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (0.233 g)

no cloreto de metileno (10 mL) na presença de CuBr (0.0083 g), de DIEA (0.01 mL) e de trifenilfosfina (0.015 g), por 18 h. O trabalho de extração, incluindo a lavagem com 0.1 M EDTA (10 mL) e cromatografia por flash, rendeu 0.891 g como espuma amarela. (rendimento = 93%), tempo de ret. de HPLC: 2.60 min. O espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1753.3 (M+H), m/e 1751.6 (M-H), 1864.5 (M+TFA), consistente com a estrutura. Finalmente, a desproteção do penúltimo intermediário (0.22g) com uma mistura do ácido dicloroacético (0.3 mL) e o anisol (0.03 mL) em cloreto de metileno (3 mL), seguida pela precipitação com éter, rendeu 0.18 g (rendimento de 97%) de CL2A-SN-38; (7) no esquema-3) como pó amarelo-claro. Tempo de ret. de HPLC: 1.88 min. O espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1480.7 (M+H), 1478.5 (M-H), consistente com a estrutura.

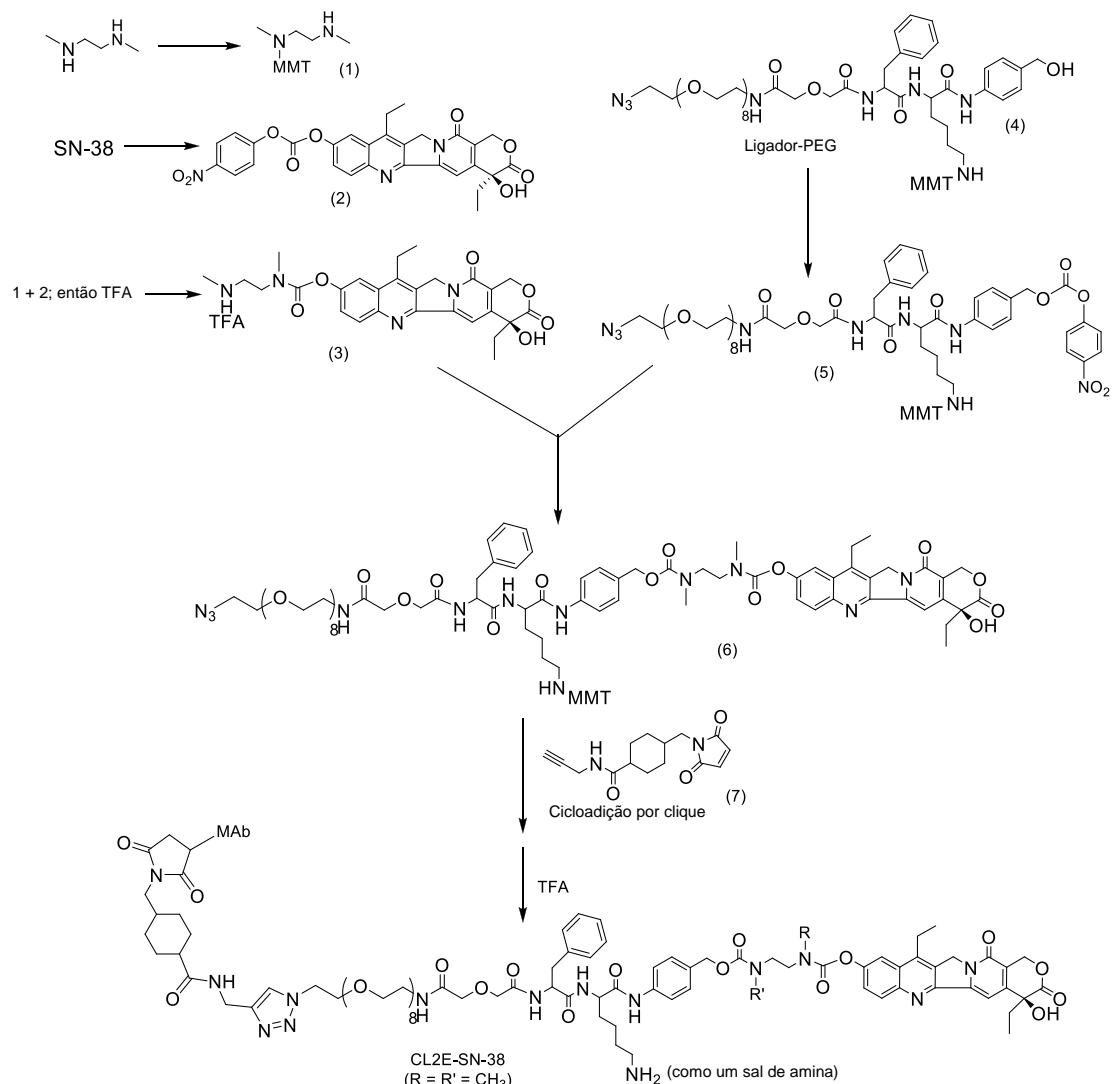
Exemplo 7. Preparação de CL2E-SN-38

[00229] A N, N'- dimetiletilenodiamina (3 mL) em cloreto de metileno (50 mL) foi reagida com cloreto de monometoxitritil (1.7g). Após 1 h sendo agitado, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto foi recuperado pelo trabalho de extração (óleo amarelo; 2.13 g). Todas as análises de HPLC foram executadas pelo método B, conforme indicado em "Geral" na seção 0148. Tempo de ret. de HPLC: 2.28 minutos. Este intermediário ((1) no esquema-4; 0.93g) foi adicionado *in situ* ao SN-38 ativado e posteriormente ((2) no esquema-4) foi preparado reagindo SN-38 (0.3 g) com *p*- nitrofenilcloroformato (0.185 g) e DIEA (0.293 mL) em DMF por 1 h. Após a remoção do solvente, o resíduo foi purificado em sílica em gel desativada para obter 0.442 g como um sólido branco.

[00230] Este intermediário (0.442 g) foi desprotegido com uma mistura de ácido trifluoroacético (1 mL) e anisol (0.1 mL) em cloreto de metileno (5 mL), seguido pela precipitação com éter para obter 0.197 g do

produto ((3) no esquema-4) como sólido branco. Este intermediário ((3); 0.197g) foi acoplado a um ligante PEG incorporado de dipeptídeo contendo azida ((5) no esquema-4), ativação que foi feita pela reação do ligante PEG ((4) no esquema-4; 0.203 g) com carbonato de bis(4-nitrofenil) (0.153 g) e DIEA (0.044 mL) no cloreto de metileno (8 mL). A cromatografia de flash rendeu 0.2 g de um produto intermediário SN-38 derivado de azida ((6) no esquema-4) como um sólido vítreo. Tempo de ret. de HPLC: 2.8 min., o espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1740.5 (M+H), m/e 1762.9 (M+Na), m/e 1774.9 (M+Cl⁻), consistente com a estrutura. Este intermediário ((6) no esquema-4; 0.2g) foi sujeitado à cicloadição de clique com 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida (0.067 g) em cloreto de metileno em presença de CuBr (0.007 g), DIEA (0.008 mL) e de trifenilfosfina (0.012 g) por 18 h. O trabalho da mistura de reação, com o tratamento com 0.1M EDTA incluso, seguido por cromatografia de flash, rendeu 0.08 g do penúltimo intermediário como espuma amarelo-claro. HPLC: t_R = 2.63 min. O espectro de massa de eletrospray apresentou picos em m/e 2035.9 (M+Na⁺), m/e 2047.9 (M+Cl⁻), consistente com a estrutura. Por fim, a desproteção deste intermediário (0.08 g) com uma mistura do ácido trifluoroacético (0.2 mL), do anisol (0.12 mL) e de água (0.06 mL) em cloreto de metileno (2 mL), seguida pela precipitação com éter, rendeu 0.051 g do produto, CL17-SN-38 (referido também como CL2E-SN-38), como pó amarelo-claro (rendimento = 69%). Tempo de ret. de HPLC: 1.95 min., pureza de ~ 99%. O espectro de massa de eletrospray apresentou picos a m/e 1741.1 (M+H), 1775.5 (M+Cl⁻), consistente com a estrutura.

Esquema-4: Preparação de CL2E-SN-38



Exemplo 8. Conjugação de produtos bifuncionais SN-38 para anticorpos levemente reduzidos

[00231] O MAb anti-CEACAM5 humanizado, hMN-14 (também conhecido como labetuzumabe), o MAb anti-CD22 humanizado, hLL2 (também conhecido como epratuzumabe), o MAb anti-CD20 humanizado, hA20 (também conhecido como veltuzumabe), o MAb anti-EGP-1 humanizado, hRS7 e o MAb antimucina humanizado, hPAM4 (também conhecido como clivatuzumabe), foram usados nestes estudos. Cada anticorpo foi reduzido com ditiotreitol (DTT), usado em um excesso molar de 50 a 70 dobras, em PBS de 40 mM, pH 7.4, contendo EDTA de 5.4 mM, a 37 °C (banho) por 45 min. O produto reduzido foi purificado por cromatografia de exclusão lateral e/ou diafiltragem,

e foi permutado em tampão para um tampão apropriado em pH 6.5. O índice de tiol foi determinado por análise de Ellman e estava na faixa de 6.5-8.5 SH/IgG. Alternativamente, os anticorpos foram reduzidos com fosfina de Tris (2-carboxietil) (TCEP) no tampão de fosfato em pH na faixa de 5–7, seguido pela conjugação *in situ*. O MAb reduzido foi reagido com o excesso molar de ~ 10 a 15 dobras de ‘CL6-SN-38’ do exemplo 1, ou ‘CL7-SN-38’ do exemplo 2, ou ‘CL6-SN-38-10-O-CO₂Et’ do exemplo 3, ou ‘CL7-SN-38-10-O-CO₂Et’ do exemplo 4, CL2A-SN-38 do exemplo 6, ou CL2E-SN-38 do exemplo 7 usando DMSO a 7–15% v/v como co-solvente e incubando por 20 a uma temperatura ambiente. O conjugado foi purificado por SEC centrifugado, passagem através de uma coluna hidrofóbica e finalmente por ultrafiltragem-diafiltragem. O produto foi analisado para SN-38 por absorção a 366 nM e correlacionado com valores padrão, ao passo que a concentração de proteína foi deduzida a partir de absorção a 280 nM, corrigida por alastramento de absorção de SN-38 neste comprimento de onda. Dessa maneira, as proporções de substituição de SN-38/MAb foram determinadas. Os conjugados purificados foram armazenados como formulações liofilizadas em frascos de vidro, tampados sob vácuo e armazenados a –20 °C em um freezer. As proporções molares da substituição de SN-38 (MSR) obtidas para alguns destes conjugados, que estavam tipicamente na escala de 5 a 7, são mostradas na **tabela 7**.

Tabela 7: Proporções da substituição molar (MSR) de SN-38/MAb em alguns conjugados

MAb	Conjugado	MSR
hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38], usando o ligante de droga do exemplo 10	6.1
	hMN-14-[CL6-SN-38], usando o ligante de droga do exemplo 1	6.8

	hMN-14-[CL7-SN-38], usando o ligante de droga do exemplo 2	5.9
	hMN-14-[CL7-SN-38-10-O-CO ₂ Et], usando o ligante de droga do exemplo 4	5.8
	hMN-14-[CL2E-SN-38], usando o ligante de droga do exemplo 11	5.9
hRS7	hRS7-CL2A-SN-38 usando o ligante de droga do exemplo 10	5.8
	hRS7-CL7-SN-38 usando o ligante de droga do exemplo 2	5.9
	hRS7-CL7-SN-38 (Et) usando o ligante de droga do exemplo 4	6.1
hA20	hA20-CL2A-SN-38 usando o ligante de droga do exemplo 10	5.8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38 usando o ligante de droga do exemplo 10	5.7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38 usando o ligante de droga do exemplo 10	5.9

Exemplo 9. Eficácia terapêutica *in vivo* em modelos pré-clínicos de carcinoma de cólon ou pancreático humano.

[00232] Camundongos nude (fêmeas) atípicos imunocomprometidos portadores de xenoenxertos de tumor de cólon ou pancreático humano subcutâneo foram tratados com um conjugado específico CL2A-SN-38, um conjugado de controle ou permaneceram sem tratamento. As eficácia terapêutica dos conjugados específicos foram observadas. A FIG. 1 mostra um modelo de tumor pancreático Capan 1, em que os conjugados específicos CL2A-SN-38 de hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina) e anticorpos hMN 14 (anti-CEACAM5) mostraram eficácia melhores do que o

conjugado de controle hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) e do que o controle sem tratamento. Similarmente, em um modelo BXPC3 de câncer pancreático humano, o hRS7-CL2A-SN-38 específico apresentou melhor eficácia terapêutica do que os tratamentos de controle (FIG. 2). Do mesmo modo, em um modelo agressivo de LS174T de carcinoma de cólon humano, o tratamento com hMN-14-CL2A-SN-38 específico foi mais eficaz do que deixar sem tratamento (FIG. 3).

Exemplo 10. Terapia *in vivo* de metástase pulmonar de tumores colônicos humanos GW-39 em camundongos nude usando hMN-14-[CL1-SN-38] e hMN-14-[CL2-SN-38]

[00233] Um modelo metastático pulmonar de carcinoma colônico foi estabelecido em um camundongo nude por injeção intravenosa de suspensão de tumor colônico humano GW-39 e a terapia foi iniciada 14 dias depois. Os conjugados do anticorpo específico anti-CEACAM5, hMN14-CL1-SN-38 e hMN14-CL2-SN-38, assim como os conjugados de controle não-visado de anti-CD22 MAb, hLL2-CL1-SN-38 e hLL2-CL2-SN-38 e misturas de equidose de hMN14 e SN-38 foram injetados em uma rotina de dose de q4d×8, usando doses diferentes. A FIG. 4 (MSR = proporção de substituição molar de SN-38/do anticorpo) apresenta efeitos terapêuticos seletivos devido aos conjugados hMN-14. Em dosagens equivalentes de 250 µg, os camundongos tratados com hMN14-CL1-SN-38 ou hMN14-CL2-SN-38 mostraram uma sobrevivência mediana superior a 107 dias. Os camundongos tratados com hLL2-CL1-SN-38 e hLL2-CL2-SN-38 de anticorpos conjugados de controle, que não alvejam especificamente as células pulmonares cancerígenas, apresentaram sobrevivência mediana de 56 e 77 dias, ao passo que os camundongos tratados com hMN14 IgG não-conjugado e SN-38 livre apresentaram uma sobrevivência mediana de 45 dias, comparável ao controle por salina não-tratada de 43.5 dias. Um aumento significativo e surpreendente na eficácia do conjugado,

conjugado de SN-38 de anticorpo alvo da célula cancerígena, que foi substancialmente mais efetivo do que o anticorpo não-conjugado e o agente quimioterapêutico livre sozinhos, foi visto claramente. A resposta à dose do efeito terapêutico do anticorpo conjugado também foi observada. Estes resultados demonstram a clara superioridade dos conjugados do anticorpo de SN-38 em comparação ao efeito combinado do anticorpo não-conjugado e do SN-38 livre no mesmo sistema de câncer pulmonar humano *in vivo*.

Exemplo 11. Uso do Conjugado IgG-SN-38 Anti-TROP-2 Humanizado para Tratamento Efetivo de Diversos Cânceres Epiteliais

Resumo

[00234] A finalidade deste estudo era de avaliar a eficácia de um conjugado anticorpo-droga SN-38-anti-TROP-2 (ADC) contra vários tipos de tumores sólidos humanos e avaliar sua tolerância em camundongos e macacos, no caso do último com reatividade cruzada de tecido a hRS7 semelhantes aos humanos. Dois derivados de SN-38, CL2-SN-38 e CL2A-SN-38 foram conjugados ao anticorpo humanizado anti-TROP-2, hRS7. Os imunoconjugados foram caracterizados para estabilidade *in vitro*, ligação e citotoxicidade. A eficácia foi testada em cinco modelos de xenoenxerto de tumor sólido humano que manifestaram o antígeno TROP-2. A toxicidade foi avaliada em camundongos e macacos Cynomolgus.

[00235] Os conjugados hRS7 dos dois derivados de SN-38 eram equivalentes na substituição da droga (~6), na ligação celular ($K_d \sim 1.2\text{nmol/L}$), citotoxicidade ($IC_{50} \sim 2.2\text{ nmol/L}$) e na estabilidade do soro *in vitro* ($t_{1/2} \sim 20$ horas). A exposição das células ao ADC apresentou passagens sinalizantes conduzindo à clivagem de PARP, mas diferenças *contra* SN-38 livre em regulações positivas de p53 e p21 foram notadas. Efeitos antitumores significativos foram produzidos por hRS7-SN-38 em doses não-tóxicas em

camundongos portando Calu-3 ($P \leq 0.05$), Capan-1 ($P < 0.018$), BxPC-3 ($P < 0.005$) e tumores COLO 205 ($P < 0.033$) quando comparados aos ADCs de controle não-direcionante. Os camundongos toleraram uma dose de $\times 2$ 12 mg/kg (equivalentes ao SN-38) com elevações apenas de vida curta em níveis de enzima do fígado ALT e AST. Os macacos Cynomolgus infundidos com 2 x 0.96 mg/kg exibiram diminuições apenas transientes em contagens sanguíneas, embora, substancialmente, os valores não tenham reduzido abaixo dos níveis normais.

[00236] Nós concluímos que o anti-TROP-2 hRS7-CL2A-SN-38 CAD forneceu efeitos significativos e efeitos antitumores específicos contra uma gama de tipos de tumores sólidos humanos. Foi bem tolerado nos macacos, com a expressão do tecido TROP-2 similar à dos seres humanos. (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69.)

Relevância Translacional

[00237] O tratamento irinotecano bem-sucedido de pacientes com tumores sólidos foi limitado devido, em grande parte, ao baixo índice de conversão da prodroga CPT-11 no metabólito SN-38 ativo. Outros examinaram formas não-direcionantes de SN-38 como meios para superar a necessidade dessa conversão e distribuir O SN-38 de maneira passiva aos tumores. Nós conjugamos SN-38 de maneira covalente a um anticorpo anti-TROP-2 humanizado, hRS7. Esse conjugado anticorpo-droga tem efeitos antitumores específicos em uma gama de modelos de xenoenxertos de cânceres humanos s.c., incluindo carcinoma pulmonar em células não-pequenas, pancreático, colorretal e carcinomas pulmonares de células escamosas, todos em doses não-tóxicas (por exemplo, doses equivalentes cumulativas de SN-38 ≤ 3.2 mg/kg).

[00238] O TROP-2 é amplamente expresso em vários cânceres epiteliais, mas também em alguns tecidos normais e, assim, um estudo de

escalação de dose em macacos Cynomolgus foi executado para avaliar a segurança clínica desse conjugado. Os macacos toleraram equivalentes/kg de SN-38 de 24 mg apenas com toxidades menores, reversíveis. Considerado o fato de ter o tumor como alvo e o perfil de segurança, o hRS7-SN-38 pode fornecer uma melhoria na gerência dos tumores sólidos receptivo ao irinotecano.

Introdução

[00239] O antígeno trofoblasto humano de superfície celular (TROP-2), também conhecido como GA733-1 (antígeno gástrico 733-1), EGP-1 (glicoproteína-1 epitelial) e TACSTD2 (transdutor com sinal de cálcio associado ao tumor) é expresso em uma variedade de carcinomas humanos e tem o significância prognóstica em alguns, estendo associada a mais de uma doença agressiva (ver, por exemplo, Alberti et al., 1992, Hybridoma 11:539-45; Stein et al., 1993, Int J Cancer 55:938-46; Stein et al., 1994, Int J Cancer Suppl. 8:98-102). Estudos do papel funcional do TROP-2 na linha celular de câncer pancreático de um camundongo transfetado com TROP-2 de murina revelaram uma proliferação aumentada sob condições de baixo soro, migração e crescimento *in vitro* independente de ancoragem e taxa de crescimento potencializada com evidência de expressão *in vivo* aumentada de Ki-67 e uma elevada tendência a metastatizar (Cubas et al., 2010, Mol Cancer 9:253).

[00240] A distribuição do antígeno de TROP-2 em muitos cânceres epiteliais faz dele um alvo terapêutico atrativo. Stein e seus colegas (1993, Int J Cancer 55:938-46) caracterizaram um anticorpo, designado RS7-3G11 (RS7), que ligou-se a EGP-1, que estava presente em uma quantidade de tumores sólidos, mas o antígeno também foi expresso em alguns tecidos normais, geralmente em uma intensidade mais baixa ou em regiões restritas. As eficácia terapêutica e de alvo foram documentadas em uma quantidade de

xenoenxertos de tumores humanos utilizando-se RS7 radiomarcado (Shih et al., 1995, *Cancer Res* 55:5857s-63s; Stein et al., 1997, *Cancer* 80:2636-41; Govindan et al., 2004, *Breast Cancer Res Treat* 84:173-82), mas esse anticorpo internalizante não apresentou atividade terapêutica em forma não-conjugada (Shih et al., 1995, *Cancer Res* 55:5857s-63s). Entretanto, *in vitro* ele demonstrou atividade citotóxica celular dependente de anticorpo (ADCC) contra carcinomas positivos TROP-2.

[00241] Nós relatamos a preparação dos conjugados anticorpo-droga (ADC) usando um IgG anti-CEACAM5 (CD66e) acoplado a vários derivados de SN-38, um inibidor topoisomerase-I que é o componente ativo do irinotecano ou CPT-11 (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26; Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61). Os derivados variaram em sua estabilidade de soro *in vitro* e estudos *in vivo* descobriram uma forma (designada CL2) de ser mais efetivo do que outros vínculos com mais ou com menos estabilidade na prevenção ou detenção do crescimento de xenoenxertos de cânceres pancreático e colônico humano.

[00242] Substancialmente, esses efeitos ocorreram em doses não-tóxicas, com a testagem inicial sendo incapaz de determinar a toxicidade da limitação da dose (Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61). Estes resultados foram estimulantes, mas também surpreendentes, porque o anticorpo CEACAM5 não internaliza, uma propriedade tida como crítica ao sucesso de um ADC. Nós especulamos que a atividade terapêutica do conjugado anti-CEACAM5-SN-38 pode estar relacionada à liberação lenta de SN-38 dentro do tumor atrás do anticorpo localizado. Visto que o irinotecano funciona melhor quando as células são expostas durante a fase-S de seu ciclo de crescimento, espera-se que uma liberação sustentada melhore as respostas. Com efeito, o SN-38 acoplado a agentes de plasma, não-direcionantes, como o

glicol de polietileno ou micelas, mostraram eficácia melhorada sobre o irinotecano ou o SN-38 sozinhos (por exemplo, Koizumi et al., 2006, Cancer Res 66:10048-56), conferindo uma sustentação adicional a esse mecanismo.

[00243] Dada a ampla reatividade do anticorpo RS7 com cânceres epiteliais e a sua habilidade de internalização, nós levantamos a hipótese de que um conjugado RRS7-SN-38 poderia beneficiar não apenas a liberação sustentada da droga, mas também formar distribuição intracelular direta. Consequentemente, nós preparamos e testamos a eficácia dos conjugados SN-38 usando uma versão humanizada do anticorpo RS7 de murina (hRS7). Uma ligeira modificação foi feita no derivado de SN-38(Govindan et al., 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61), o que melhorou a qualidade do conjugado sem alterar a sua estabilidade *in vitro* ou a sua eficácia *in vivo*. Esse novo derivado (designado CL2A) é atualmente o agente preferido para SN-38 acoplado a anticorpos. Aqui, mostramos a eficácia do conjugado hRS7-SN-38 em diversas linhas celulares de câncer epitelial implantada em camundongos nude em dosagens não-tóxicas, com outros estudos revelando que doses substancialmente mais elevadas podem ser toleradas. Mais importante, os estudos de toxicidade em macacos que também expressam TROP-2 em tecidos semelhantes aos dos humanos mostraram que o hRS7-SN-38 era tolerado em quantidades consideravelmente mais elevadas do que a dose terapeuticamente efetiva em camundongos, fornecendo evidência de que esse conjugado é um agente promissor para o tratamento de pacientes com uma ampla gama de cânceres epiteliais.

Materiais e Métodos

[00244] Linhos celulares, anticorpos e quimioterapêuticos. Todas as linhas celulares humanas usadas neste estudo foram adquiridas a partir da American Type Culture Collection. Estes incluem Calu-3 (carcinoma pulmonar

de célula não-pequena), SK-MES-1 (carcinoma pulmonar de célula escamosa), COLO 205 (adenocarcinoma colônico), Capan-1 e BxPC-3 (adenocarcinomas pancreáticos) e PC-3 (adenocarcinomas prostáticos). O IgG RS7 humanizado, o anti-CD20 humanizado de controle (hA20 IgG, veltuzumabe) e os anticorpos anti-CD22 (hLL2 IgG, epratuzumabe) foram preparados em Immunomedics, Inc. Irinotecano (20 mg/mL) foi obtido a partir de Hospira, Inc.

[00245] Imunoconjugados SN-38 e aspectos *in vitro*. A síntese de CL2-SN-38 foi descrita anteriormente (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Sua conjugação para hRS7 IgG e a estabilidade do soro foram executadas conforme descrito (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26; Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61). Preparações de CL2A-SN-38 (M.W. 1480) e seu conjugado hRS7 e os estudos de estabilidade, ligação e citotoxicidade foram conduzidos conforme descrito anteriormente (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Os lisatos celulares foram preparados e executou-se immunoblotting para p21^{Waf1/Cip}, p53 e PARP (poli-ADP-ribose polimerase).

[00246] Estudos terapêuticos *in vivo*. Para todos os estudos em animais, as doses dos imunoconjugados de SN-38 e irinotecano são mostrados em equivalentes do SN-38. Baseado em uma proporção de substituição de SN-38/IgG média de 6, uma dose de ADC de 500 μ g a um rato de 20 g (25 mg/kg) contém 0.4 mg/kg de SN-38. As doses de irinotecanos são da mesma maneira mostradas como equivalentes do SN-38 (isto é, irinotecano/kg de 40 mg equivale a 24 mg/kg de SN-38). Camundongos nude (*nu/nu*) atípicos fêmeas NCr, com idades entre 4 e 8 semanas, e camundongos Swiss-Webster machos, com idade de 10 semanas, foram comprados da Taconic Farms. Estudos de tolerabilidade foram executados em macacos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*; 2.5–4 kg, machos e fêmeas) por SNBL USA, Ltd. Os animais receberam implantações subcutâneas de diferentes linhas celulares de

cânceres humanos. O volume do tumor (TV) foi determinado por medidas em 2 dimensões usando calibradores, com os volumes definidos como: $L \times w^2/2$, onde L é a dimensão mais longa do tumor e w é a mais curta. Os tumores variaram de tamanho entre 0.10 e 0.47 cm³ quando a terapia começou. Os regimes de tratamento, dosagem e quantidade de animais em cada experimentos encontram-se descritos em Resultados. O hRS7-CL2A-SN-38 liofilizado e o ADC de controle foram reconstituídos e diluídos conforme requerido em uma salina estéril. Todos os reagents foram administrados intraperitonealmente (0.1 mL), exceto o irinotecano, que foi administrado intravenosamente. O regime de dosagem foi influenciado por nossas investigações anteriores, onde o ADC foi dado de 4 em 4 dias ou duas vezes por semana por variados intervalos de tempo (Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26; Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61). Esta frequência de dosagem refletiu uma consideração da meia-vida do soro do conjugado *in vitro*, para permitir uma exposição mais contínua ao ADC.

[00247] Estatísticas. As curvas de crescimento foram determinadas como mudança percentual no TV inicial sobre o tempo. A análise estatística do crescimento do tumor foi baseada na área sob a curva (AUC). Os perfis de crescimento individual do tumor foram obtidos através da modelagem da curva linear. Um teste-*f* foi empregado para determinar a igualdade da variação entre grupos antes da análise estatística das curvas de crescimento. Um teste-*t* de cauda dupla foi usado para avaliar a significância estatística entre os vários grupos e controles de tratamento, exceto o controle de salina, onde um teste-*t* de uma cauda foi usado (significância a $P \leq 0.05$). As comparações estatísticas de AUC foram executadas somente até o momento que o primeiro animal de um grupo foi eutanasiado devido à progressão.

[00248] Farmacocinéticos e biodistribuição. ¹¹¹hRS7-CL2A-SN-38 In-

radiomarcado e IgG hRS7 foram injetados no camundongo nude portador de s.c. Tumores SK-MES-1 (~ 0.3 cm 3). Injetou-se de maneira intravenosa 20 μ Ci (proteína de 250- μ g) de ^{111}In -hRS7-CL2A-SN-38 em um grupo, enquanto outro grupo recebeu 20 μ Ci (proteína de 250- μ g) de ^{111}In -hRS7 IgG. Em vários pontos no tempo os camundongos (5 por ponto no tempo) foram anestesiados, sangraram via puntura intracardíaca e então foram eutanasiados. Os tumores e os vários tecidos foram removidos, pesados e contados por cintilação γ para determinar a porcentagem de dose injetada por grama de tecido (% de ID/g). Um terceiro grupo foi injetado com 250 μ g de hRS7-CL2A-SN-38 não-marcado 3 dias antes da administração de ^{111}In -hRS7-CL2A-SN-38 e foi necropsiado da mesma maneira. Um teste-*t* de 2 caudas foi usado para comparar a captação de hRS7-CL2A-SN-38 e de IgG hRS7 após determinar a igualdade de variação utilizando o teste-*f*. A análise farmacocinética na depuração sanguínea foi executada utilizando-se um software WinNonLin (Parsight Corp.).

[00249] Tolerabilidade em camundongos Swiss-Webster e macacos Cynomolgus. Momentaneamente, os camundongos foram classificados em 4 grupos, cada um recebendo injeções i.p. de 2 mL com controle de tampão de acetato de sódio ou 3 doses diferentes de hRS7-CL2A-SN-38 (4, 8, ou 12 mg/kg de SN-38) nos dias 0 e 3, seguido de coleta de sangue e de soro, conforme descrito em Resultados. Os macacos cynomolgus (3 machos e 3 fêmeas; 2.5–4.0 kg) receberam administrações de 2 doses diferentes de hRS7-CL2A-SN-38. As dosagens, os tempos e a quantidade de macacos sangrados para a avaliação de possíveis toxicidades hematológicas e produtos químicos de soro encontram-se descritos em Resultados.

Resultados

[00250] Estabilidade e potência de hRS7-CL2A-SN-38. Duas ligações diferentes foram usadas para conjugar o SN-38 para IgG hRS7. O primeiro é

denominado CL2-SN-38 e foi descrito anteriormente (Moon et al., 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan et al., 2009, ClinCancer Res 15:6052-61). Uma mudança menor foi feita na síntese do ligante de CL2 em que a meação de fenilalanina foi removida. Esta mudança simplificou a síntese, mas não afetou o resultado da conjugação (por exemplo, o CL2-SN-38 e o CL2A-SN-38 incorporaram ~6 SN-38 por molécula de IgG). Comparações lado a lado não descobriram diferenças significativas na estabilidade do soro, na ligação de antígeno ou na citotoxicidade *in vitro* (não mostrado).

[00251] Para confirmar que a mudança no ligante SN-38 de CL2 a CL2A não impactou a potência *in vivo*, o hRS7-CL2A e o hRS7-CL2-SN-38 foram comparados em camundongos portando tumores COLO 205 ou Capan-1 (não mostrado), utilizando 0.4 mg ou 0.2 mg/kg de SN-38 duas vezes por semana × 4 semanas, respectivamente, e com tumores iniciais de 0.25 cm³ em ambos os estudos. Os conjugados de hRS7-CL2A e CL2-SN-38 inibiram significativamente o crescimento do tumor em comparação àqueles não-tratados (AUC_{14dias}*P* < 0.002 contra salina em modelo COLO 205; AUC_{21dias}*P* < 0.001 contra salina no modelo Capan-1), e um ADC de controle anti-CD20 não-direcionante, hA20-CL2A-SN-38 (AUC_{14dias}*P* < 0.003 no modelo COLO-205; AUC_{35dias}: *P* < 0.002 no modelo Capan-1). Ao fim do estudo (dia 140) no modelo Capan-1, 50% dos ratos tratados com o hRS7-CL2A-SN-38 e 40% dos ratos do hRS7-CL2-SN-38 estavam livres de tumores, enquanto apenas 20% dos animais tratados com hA20-ADC não tinham sinais aparentes da doença. Substancialmente, não havia nenhuma diferença em eficácia entre os 2 conjugados específicos em ambos os modelos do tumor.

[00252] Mecanismo de ação. Estudos da citotoxicidade *in vitro* demonstraram que o Hrs7-CL2A teve valores de IC₅₀ em escala de nmol/L contra várias linhas de tumores sólidos diferentes (**tabela 8**). O IC₅₀ com SN-38

livre foi mais baixo do que o conjugado em todas as linhas celulares. Embora não houvesse nenhuma correlação entre a expressão de TROP-2 e a sensibilidade a hRS7-CL2A-SN-38, a proporção de IC_{50} do ADC contra o SN-38 foi mais baixa nas células com expressão de TROP-2 mais elevada, com mais chances de refletir a habilidade potencializada de internalizar a droga quando mais抗ígenos estão presentes.

Tabela 8. A expressão de TROP-2 e da citotoxicidade *in vitro* do SN-38 e do hRS7-SN-38 em diversas linhas de tumores sólidos

Linha celular	Expressão de TROP-2 via FACS			Resultados de citotoxicidade				Proporção de ADC/SN-38 livre
	Fluorescência mediana (fundo)	Positivo percentual	SN-38	95% CI	hRS7-SN-38 ^a	95% CI		
				IC_{50} (nmol/L)		IC_{50} (nmol/L)		
Calu-3	282,2 (4,7)	99,6%	7,19	5,77–8,95	9,97	8,12–12,25	1,39	
COLO 205	141,5 (4,5)	99,5%	1,02	0,66–1,57	1,95	1,26–3,01	1,91	
Capan-1	100,0 (5,0)	94,2%	3,50	2,17–5,65	6,99	5,02–9,72	2,00	
PC-3	46,2 (5,5)	73,6%	1,86	1,16–2,99	4,24	2,99–6,01	2,28	
SK-MES-1	44,0 (3,5)	91,2%	8,61	6,30–11,76	23,14	17,98–29,78	2,69	
BxPC-3	26,4 (3,1)	98,3%	1,44	1,04–2,00	4,03	3,25–4,98	2,80	

O valor de $^aIC_{50}$ é mostrado como equivalentes de SN-38 de hRS7-SN-38

[00253] Sabe-se que o SN-38 ativa diversas passagens sinalizantes nas células, levando a apoptose. Nossos estudos iniciais examinaram a expressão de 2 proteínas envolvidas nos eventos sinalizantes iniciais ($p21^{Waf1/Cip1}$ e p53) e em 1 evento apoptótico tardio [clivagem da polimerase poli-ADP-ribose(PARP)] *in vitro* (não mostrado). Em BxPC-3, SN-38 conduziu a

um aumento de 20 dobras na expressão p21^{Waf1/Cip1}, enquanto o hRS7-CL2A-SN-38 resultou em um aumento de apenas 10 dobras, uma descoberta consistente com a atividade mais elevada com o SN-38 na linha celular (**tabela 8**). No entanto, o hRS7-CL2A-SN-38 aumentou a expressão de p21^{Waf1/Cip1} em Calu-3 em mais do que 2 dobras sobre o SN-38 livre (não mostrado).

[00254] Uma disparidade maior entre o hRS7-CL2A-SN-38- e os eventos sinalizantes mediados por SN-38 livre foi observada na expressão p53. Tanto em BxPC-3 quanto em Calu-3, a regulação positiva de p53 com o SN-38 livre não ficou evidente antes de 48 horas, enquanto que o hRS7-CL2A-SN-38 apresentou regulação positiva de p53 em 24 horas (não mostrado). Além disso, a expressão de p53 células expostas ao ADC foi maior em ambas as linhas celulares em comparação ao SN-38 (não mostrado). Curiosamente, embora o IgG hRS7 não tenha apresentado nenhum efeito apreciável sobre a expressão de p21^{Waf1/Cip1}, ele não induziu a regulação positiva de p53 em BxPC-3 e Calu-3, mas apenas após uma exposição de 48 horas. Quanto aos eventos apoptóticos tardios, a clivagem de PARP ficou evidente em ambas as linhas celulares quando incubadas com o SN-38 ou com o conjugado (não mostrado). A presença do PARP clivado foi mais elevada a 24 horas em BxPC-3, o que que correlaciona com a expressão elevada de p21 e de seu IC₅₀ mais baixo. O grau mais elevado de clivagem com o SN-38 livre sobre ADC foi consistente com as descobertas de citotoxicidade.

[00255] Eficácia de hRS7-SN-38. Visto que o TROP-2 é amplamente expresso em diversos carcinomas humanos, os estudos foram executados em diversos modelos de cânceres humanos, que começaram com uma avaliação da ligação hRS7-CL2-SN-38, mas posteriormente conjugados com a ligação de CL2A foram utilizados. Os camundongos nude portadores de Calu-3 que receberam 0.04 mg de SN-38/kg do hRS7-CL2-SN-38 de 4 em 4 dias tiveram

uma resposta significativamente melhorada em comparação à dos animais que receberam uma quantidade equivalente de hLL2-CL2-SN-38 (TV = 0.14 ± 0.22 cm³ contra 0.80 ± 0.91 cm³, respectivamente; AUC_{42dias} $P < 0.026$; **FIG. 5A**). Uma resposta à dose foi observada quando a dose foi aumentada para 0.4 mg/kg de SN-38. A este nível de dose maior, todos os camundongos que receberam o conjugado específico hRS7 foram "curados" dentro de 28 dias e permaneceram livres de tumor até o fim do estudo, no dia 147, enquanto os tumores voltaram a crescer nos animais tratados com o ADC irrelevante (AUC específico contra irrelevante de _{98dias}: $P = 0.05$). Nos camundongos recebendo a mistura de IgG hRS7 e SN-38, os tumores progrediram a >4.5 dobras pelo dia 56 (TV = ± 1.10 0.88 cm³; AUC de _{56dias} $P < 0.006$ contra hRS7-CL2-SN-38).

[00256] A eficácia também foi examinada em xenoenxertos de tumores colônicos (COLO 205) e pancreáticos (Capan-1) humanos. Em animais portadores do tumor COLO 205, (**FIG. 5B**), o hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg, q4dx8) previu o crescimento do tumor durante o período de tratamento de 28 dias com tumores significativamente menores em comparação ao ADC de controle anti-CD20 (hA20-CL2-SN-38) ou o IgG hRS7 (TV = 0.16 ± 0.09 cm³, 1.19 ± 0.59 cm³ e 1.77 ± 0.93 cm³, respectivamente; AUC de _{28dias} $P < 0.016$). O MTD de irinotecano (24 mg de SN-38/kg, q2dx5) foi tão eficaz quanto o hRS7-CL2-SN-38, porque o soro de camundongo pode converter de maneira mais eficiente o irinotecano para SN-38 do que o soro humano, mas a dose de SN-38 no irinotecano (cumulativo de 2,400 µg) foi 37.5 dobras maior do que aquele com o conjugado (total de 64 µg).

[00257] Os animais portadores de Capan-1 não mostraram nenhuma resposta significativa apenas ao irinotecano quando dado a um equivalente de dose do SN-38 para o conjugado hRS7-CL2-SN-38 (por exemplo, no dia 35, o tamanho médio do tumor era de 0.04 ± 0.05 cm³ nos animais que receberam

0.4 mg de SN-38/kg hRS7-SN-38 contra ± 1.78 0.62 cm^3 nos animais tratados com irinotecano que receberam 0.4 mg/kg SN-38; AUC do_{dia35} $P < 0.001$; **FIG. 5C**). Quando a dose de irinotecano foi aumentada para 10 dobras para o SN-38 de 4 mg/kg, a resposta melhorou, mas ainda não foi tão significativa quanto o conjugado a um nível de dose de 0.4 mg/kg de SN-38 (TV = $0.17 \pm 0.18 \text{ cm}^3$ contra $1.69 \pm 0.47 \text{ cm}^3$, AUC do_{dia49} $P < 0.001$). Uma dose igual do hA20-CL2-SN-38 não-direcionante também teve um efeito antitumor significativo em comparação aos animais tratados com irinotecano, mas o conjugado específico hRS7 foi significativamente melhor que o ADC irrelevante (TV = $0.17 \pm 0.18 \text{ cm}^3$ contra $0.80 \pm 0.68 \text{ cm}^3$, AUC do_{dia49} $P < 0.018$).

[00258] Os estudos com o ADC hRS7-CL2A-SN-38 foram estendidos a 2 outros modelos de cânceres epiteliais humanos. Nos camundongos portadores de tumores pancreáticos humanos BxPC-3 (**FIG. 5D**), hRS7-CL2A-SN-38 outra vez inibiu significativamente o crescimento do tumor em comparação aos camundongos de controle tratados com salina ou uma quantidade equivalente de hA20-CL2A-SN-38 não-direcionante (TV = $0.24 \pm 0.11 \text{ cm}^3$ contra ± 1.17 0.45 cm^3 e $1.05 \pm 0.73 \text{ cm}^3$, respectivamente; AUC_{dia21} $P < 0.001$) ou irinotecano dado a uma dose de equivalente de SN-38 10 dobras maiores (TV = $0.27 \pm 0.18 \text{ cm}^3$ contra $0.90 \pm 0.62 \text{ cm}^3$, respectivamente; AUC_{dia25} $P < 0.004$). Curiosamente, nos camundongos portadores de tumores pulmonares humanos de célula escamosa SK-MES-1 tratados com 0.4 mg/kg do ADC (**FIG. 5E**), a inibição do crescimento do tumor foi superior à salina ou ao IgG hRS7 não-conjugado (TV = $0.36 \pm 0.25 \text{ cm}^3$ vs. $1.02 \pm 0.70 \text{ cm}^3$ e $1.30 \pm 1.08 \text{ cm}^3$, respectivamente; AUC_{28 dias}, $P < 0.043$), mas o hA20-CL2A-SN-38 não-direcionante ou o MTD do irinotecano ofereceram os mesmos efeitos antitumores do conjugado específico hRS7-SN-38. Em todos os estudos em murina, o ADC do hRS7-SN-38 foi bem tolerado quanto à perda do peso do

corpo (não mostrado).

[00259] Biodistribuição de hRS7-CL2A-SN-38. As biodistribuições de hRS7-CL2A-SN-38 ou o IgG hRS7 não-conjugado foram comparados em camundongos portadores de xenoenxertos de carcinoma pulmonar humano com célula escamosa SK-MES-1 (não mostrado), usando os respectivos substratos In-marcados¹¹¹. Uma análise farmacocinética foi executada para determinar a depuração do hRS7-CL2A-SN-38 em relação ao hRS7 não-conjugado (não mostrado). O ADC depurou mais rapidamente do que a quantidade equivalente do hRS7 não-conjugado, com o ADC exibindo meia-vida ~40% mais curta e um tempo de residência baixo. No entanto, isso teve um impacto mínimo na absorção do tumor (não mostrado). Embora tenha havido diferenças significativas nos pontos de tempo entre 24 e 48 horas, por 72 horas (absorção de pico) as quantidades de ambos os agentes no tumor foram semelhantes. Entre os tecidos normais, as diferenças hepáticas e esplênicas foram as mais notáveis (não mostrado). Em 24 horas pós-injeção, havia >2 dobras a mais do hRS7-CL2A-SN-38 no fígado do que do IgG hRS7. Inversamente, no baço havia 3 dobras a mais do IgG hRS7 parental presente na absorção de pico (ponto de tempo de 48 horas) do que do hRS7-CL2A-SN-38. A absorção e a depuração no restante dos tecidos geralmente refletiram diferenças na concentração do sangue.

[00260] Visto que as doses de duas vezes por semana foram dadas como terapia, a absorção do tumor em um grupo de animais que receberam primeiro uma pré-dose de 0.2 mg/kg (proteína de 250 µg) do ADC hRS7 3 dias antes de a injeção do anticorpo In-marcado¹¹¹ ter sido examinado. A absorção do ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38 em camundongos pré-dosados foi substancialmente reduzida em todos os pontos de tempo em comparação aos animais que não receberam a pré-dose (por exemplo, a 72 horas, a absorção do tumor com pré-

dosagem foi de 12.5% o \pm 3.8% ID/g contra 25.4% \pm 8.1% ID/g nos animais que não receberam a pré-dose; $P = 0.0123$). A pré-dosagem não teve nenhum impacto apreciável na depuração do sangue ou na absorção do tecido (não mostrado). Estes estudos sugerem que em alguns modelos de tumor, a acreção do tumor do anticorpo específico pode ser reduzida pela(s) dose(s) precedentes, o que provavelmente explica por que a especificidade de uma resposta terapêutica poderia ser diminuída com o aumento de doses de ADC e por que uma escalação de dose adicional não é indicada.

[00261] Tolerabilidade de hRS7-CL2A-SN-38 em camundongos Swiss-Webster e macacos Cynomolgus. Os camundongos Swiss-Webster toleraram 2 doses por 3 dias, cada uma do SN-38 kg de 4, 8, e 12 mg do hRS7-CL2A-SN-38, com perda de peso transiente mínima (não mostrado). Nenhum toxicidade hematopoiética ocorrem e os elementos químicos do soro revelaram apenas elevada transaminase de aspartato (AST) e transaminase de alanina (não mostrado). Sete dias após o tratamento, o AST elevou-se acima dos níveis normais (>298 U/L) em todos os 3 grupos de tratamento (não mostrado), com a proporção maior dos camundongos encontrando-se no grupo de 2 x 8 mg/kg. No entanto, em 15 dias após o tratamento, a maioria dos animais estava dentro da escala normal. Os níveis de ALT também estavam acima da escala normal (>77 U/L) dentro de 7 dias de tratamento (não mostrado) e com evidência de normalização no dia 15. Os fígados de todos esses camundongos não apresentou evidência histológica de danos no tecido (não mostrado). Quanto à função renal, apenas os níveis de glicose e de cloreto foram um pouco elevados nos grupos tratados. A 2 \times 8 mg/kg, 5 dos 7 camundongos tiveram níveis de glicose ligeiramente elevados (escala de 273-320 mg/dL, extremidade superior de 263 mg/dL normais) que retornaram ao normal em 15 dias de pós-injeção. De maneira semelhante, os níveis de cloreto foram

ligeiramente elevados, variando entre 116 e 127 mmol/L (extremidade superior de 115 mmol/L de escala normal) nos 2 grupos de dosagem mais elevados (57% no grupo 2 × 8 mg/kg e 100% dos camundongos no grupo 2 × 12 mg/kg), e permaneceram elevados em até 15 dias pós-injeção. Isso também pode ser um indicativo de toxicidade gastrointestinal, pois a maioria dos cloretos é obtida através de absorção pelo intestino; no entanto, na terminação, não houve evidência histológica de danos no tecido em nenhum dos sistemas de órgãos examinados (não mostrado).

[00262] Visto que os camundongos não expressam TROP-2 ligados por hRS7, um modelo mais apropriado foi requerido para determinar o potencial do conjugado hRS7 para uso clínico. Estudos em imunohistologia revelaram ligações em múltiplos tecidos tanto nos humanos como nos macacos Cynomolgus (peito, olho, trato gastrointestinal, rim, pulmão, ovário, trompas de Falópio, pâncreas, paratiroide, próstata, glândula salivar, pele, timo, tonsila, uretra, bexiga e útero; não mostrado. Baseado nessa reação cruzada, o estudo de tolerabilidade foi executado em macacos.

[00263] O grupo que recebeu o SN-38/kg de 2 × 0.96 mg do hRS7-CL2A-SN-38 não teve nenhum evento clínico significativo depois da infusão e durante a terminação do estudo. A perda de peso não excedeu 7.3% e retornou aos pesos de aclimatização pelo dia 15. As diminuições transientes foram notadas na maioria dos dados de contagem de sangue (não mostrados), mas os valores não ficaram abaixo das escalas normais. Nenhum valor anormal foi encontrado nos elementos químicos do soro. A histopatologia dos animais necropsiados no dia 11(8 dias depois da última injeção) mostrou mudanças microscópicas em órgãos hematopoiéticos (timo, glândulos linfáticos mandibulares e mesentéricos, baço e medula óssea), órgãos gastrointestinais (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto), órgãos reprodutivos

femininos (ovário, útero e vagina) e no local da injeção. Essas mudanças variaram de mínimas a moderadas e foram totalmente revertidas ao fim do período de recuperação (dia 32) em todos os tecidos, exceto no timo e no trato gastrointestinal, que tendiam à recuperação completa neste ponto de tempo posterior.

[00264] No nível de dose do SN-38/kg de 2×1.92 mg do conjugado, houve 1 morte por conta de complicações gastrointestinais e supressão da medula óssea, e outros animais deste grupo apresentaram condições semelhantes, mas com eventos adversos mais graves do que aqueles do grupo de 2×0.96 mg/kg. Estes dados indicam que as toxicidades limitadoras de dose eram idênticas àquelas do irinotecano; quais sejam, intestinal e hematológica. Assim, o MTD para hRS7-CL2A-SN-38 encontra-se entre 2×0.96 e SN-38/kg de 1.92 mg, o que representa uma dose equivalente humana de SN-38 de 2×0.3 a 0.6 mg/kg.

Discussão

[00265] O TROP-2 é uma proteína expressada em muitos tumores epiteliais, incluindo cânceres de pulmão, de mama, colorretal, pancreáticos, de próstata e ovarianos, tornando-o um alvo potencialmente importante para a distribuição de agentes citotóxicos. O anticorpo RS7 internaliza quando ligado ao TROP-2 (Shih et al., 1995, *Cancer Res* 55:5857s-63s), que permite a distribuição intracelular direta dos citotóxicos.

[00266] A conjugação de drogas quimioterapêuticas para anticorpos foi explorada por 30 anos. Visto que uma porção substancial de um ADC não é processada pelo tumor, mas por tecidos normais, há um risco de que esses agentes não sejam tão tóxicos para sistemas de órgãos normais antes de alcançar o nível terapêutico nos tumores. Como com qualquer terapêutico, a janela terapêutica é um fator-chave para determinar o potencial de um ADC, e

assim, em vez de examinar drogas "ultratóxicas", nós escolhemos o SN-38 como o componente de droga do ADC direcionado com TROP-2.

[00267] O SN-38 é um potente inibidor de topoisomerase-I, com valores de IC_{50} na escala nanomolar em diversas linhas celulares. É a forma ativa da pró-droga, irinotecano, que é usada para o tratamento do câncer colorretal e que também apresenta atividade em cânceres de pulmão, de mama e cerebrais. Nós raciocinamos que um SN-38 diretamente direcionado, na forma de um ADC, seria um terapêutico significativamente melhorado em relação ao CPT-11, superando a bioconversão baixa e variável conforme o paciente para ativar o SN-38 do último.

[00268] O peptídeo Phe-Lys inserido no derivado de CL2 original permitiu uma possível clivagem via catepsina B. Em um esforço para simplificar o processo sintético, em CL2A, a fenilalanina foi eliminada, e assim o local de clivagem da catepsina B foi removido. Curiosamente, este produto teve um perfil cromatográfico mais bem-definido em relação ao perfil amplo obtido com CL2 (não mostrado), mas, mais importante, esta mudança não teve nenhum impacto na ligação do conjugado, na sua estabilidade ou na sua potência em testagem lado a lado. Tais dados sugerem que o SN-38 em CL2 foi liberado a partir do conjugado primeiramente pela clivagem na ligação de benzil carbonato sensível ao pH para o anel de lactona do SN-38 e não no local de clivagem da catepsina B.

[00269] A *citotoxicidade in vitro* do ADC de hRS7 contra uma escala de linhas celulares de tumores sólidos apresentou consistentemente valores de IC_{50} na escala de nmol/L. Entretanto, as células expostas ao SN-38 livre demonstraram um valor de IC_{50} mais baixo em comparação ao do ADC. Essa disparidade entre o SN-38 conjugado e o SN-38 livre também foi relatada para ENZ-2208 (Sapra et al., 2008, *Clin Cancer Res* 14:1888-96) e NK012 (Koizumi et

al., 2006, *Cancer Res* 66:10048-56). ENZ-2208 utiliza um PEG ramificado para ligar aproximadamente 3.5 a 4 moléculas de SN-38 por PEG, considerando que NK012 é uma nanopartícula micelar contendo 20% de SN-38 por peso. Com o nosso ADC, esta disparidade (isto é, a proporção de potência com SN-38 livre contra SN-38 conjugado) diminuiu enquanto os níveis de expressão de TROP-2 aumentaram nas células do tumor, sugerindo uma vantagem para a distribuição direcionada da droga. Em questão da estabilidade do soro *in vitro*, tanto as formas CL2 e CL2A-SN-38 do hRS7-SN-38 renderam um $t_{1/2}$ de ~20 horas, que está em contraste com o $t_{1/2}$ breve de 12.3 minutos relatado para ENZ-2208 (Zhao et al., 2008, *Bioconjug Chem* 19:849-59), mas é semelhante à liberação de 57% do SN-38 de NK012 sob condições fisiológicas após 24 horas (Koizumi et al., 2006, *Cancer Res* 66:10048-56).

[00270] O tratamento de camundongos portadores de tumores com hRS7-SN-38 (com CL2-SN-38 ou CL2A-SN-38) inibiu significativamente o crescimento do tumor em 5 modelos diferentes do tumor. Em 4 deles, as regressões do tumor foram observadas, e no caso do Calu-3, todos os camundongos que receberam a dose mais alta do hRS7-SN-38 ficaram livres de tumores na conclusão do estudo. Diferentemente do ocorrido entre seres humanos, o irinotecano é convertido de maneira muito eficiente a SN-38 por uma esterase de plasma em camundongos, com uma taxa de conversão superior a 50% e rendendo uma maior eficácia nos camundongos do que nos humanos. Quando o irinotecano foi administrado com 10 dobras a mais ou níveis equivalentes de SN-38, o hRS7-SN-38 foi significativamente melhor no controle do crescimento do tumor. Somente quando o irinotecano foi administrado em seu MTD de 24 mg/kg q2dx5 (37.5 dobras mais SN-38) ele igualou a eficácia do hRS7-SN-38. Nos pacientes, nós esperaríamos que esta vantagem favoreça ainda mais o hRS7-CL2A-SN-38, porque a bioconversão do

irinotecano seria substancialmente mais baixa.

[00271] Nós também mostramos em algumas linhas celulares que expressão antígenos, como SK-MES-1, que o uso de um ADC de ligação de antígeno não garante respostas terapêuticas melhores do que um conjugado sem ligação, irrelevante. Esta não é uma descoberta atípica ou inesperada. Com efeito, os conjugados SN-38 sem ligação mencionados anteriormente potencializam a atividade terapêutica se comparados ao irinotecano, e assim espera-se que um conjugado IgG-SN-38 tenha alguma atividade. Isso relaciona-se ao fato que os tumores têm vasos imaturos, vazantes, que permitem uma melhor passagem de macromoléculas do que os tecidos normais. Com o nosso conjugado, 50% do SN-38 será liberado em ~13 horas, quando o pH é reduzido a um nível que imita níveis lisossomais (por exemplo, pH 5.3 a 37°C; dados não mostrados), enquanto que no pH neutro do soro a taxa de liberação é reduzida aproximadamente em 2 dobras. Se um conjugado irrelevante entrar em um microambiente de tumor acídico, espera-se que ele libere SN-38 localmente. Outros fatores, como a fisiologia do tumor e sensibilidades inatas à droga, também exercerão uma função ao definir essa atividade de "linha de base". Entretanto, um conjugado específico com um tempo de residência maior deveria ter potencializado a potência sobre essa resposta de linha de base enquanto houvesse antígeno suficiente para capturar o anticorpo específico. Estudos de biodistribuição no modelo SK-MES-1 também mostraram que se um antígeno de tumor se torna saturado como consequência de uma dosagem sucessiva, a absorção do tumor do conjugado específico é reduzida, o que rende resultados terapêuticos semelhantes àqueles obtidos com um conjugado irrelevante.

[00272] Embora seja desafiador fazer comparações diretas entre o nosso ADC e os relatórios publicados de outros agentes distribuidores de SN-

38, algumas observações gerais podem ser feitas. Em nossos estudos da terapia, a dose individual mais elevada foi de 0.4 mg/kg de SN-38. No modelo Calu-3, somente 4 injeções foram dadas para um dose cumulativa total de SN-38 de 1.6 mg/kg ou SN-38 de 32 µg em um camundongo de 20 g. Múltiplos estudos com ENZ-2208 foram feitos utilizando-se o seu MTD de 10 mg/kg × 5, e os estudos pré-clínicos com o NK012 envolveram o seu MTD de 30 mg/kg × 3. Assim, os efeitos antitumor significativos foram obtidos com o hRS7-SN-38 a 30 dobras e equivalentes de SN-38 com 55 dobras a menos do que as doses relatadas em ENZ-2208 e NK012, respectivamente. Mesmo com o ADC de hRS7 com 10 dobras a menos (0.04 mg/kg), efeitos antitumor significativos foram observados, enquanto doses mais baixas de ENZ-2208 não foram apresentadas, e quando a dose de NK012 foi reduzida 4 dobras para 7.5 mg/kg, a eficácia foi perdida (Koizumi et al., 2006, *Cancer Res* 66:10048-56). Os camundongos normais não mostraram nenhuma toxicidade com uma dose cumulativa de SN-38 de 24 mg/kg em 1 semana (1.500 mg/kg do conjugado), indicando que o MTD era mais elevado. Assim, os animais portadores do tumor foram efetivamente tratados com quantidades de 7.5 a 15 dobras menores dos equivalentes do SN-38.

[00273] Como um inibidor de topoisomerase-I, o SN-38 induz danos significativos ao DNA de uma célula, com regulação positiva de^{WAF1/Cip1} p53 e p21 tendo por resultado a ativação de caspase e a clivagem de PARP. Quando nós expusemos as células BxPC-3 e Calu-3 ao nosso ADC, o^{WAF1/Cip1} p53 e o p21 tiveram regulação positiva acima dos níveis basais. Além disso, a clivagem de PARP também foi evidente em ambas as linhas celulares, confirmando um evento apoptótico nessas células. Interessante foi a regulação positiva maior do^{WAF1/Cip1} p21 em BxPC-3 e Calu-3 relativa a p53 pelo SN-38 e pelo nosso hRS7-SN-38. Isto pode ser indicativo do status do mutacional de p53 nessas 2 linhas

celulares e o uso de uma passagem independente de p53 para a apoptose mediata por ^{WAF1/Cip1} p21.

[00274] Uma observação interessante foi a prévia regulação positiva de p53 em BxPC-3 e Calu-3 a 24 horas mediada pelo hRS7-ADC relativo ao SN-38 livre. Mesmo o IgG de hRS7 puro poderia fazer regulação positiva de p53 nessas linhas celulares, embora apenas uma exposição de 48 horas. A superexpressão de TROP-2 e a reticulação por anticorpos foi ligada a diversos eventos sinalizadores relacionados a MAPK, assim como a liberação intracelular de cálcio. Quando a ligação do hRS7 não for suficiente para induzir apoptose em BxPC-3 e Calu-3, como evidenciado pela falta de clivagem de PARP, pode ser suficiente para iniciar uma célula, de modo que a inclusão do conjugado SN-38 ao hRS7 possa conduzir a um efeito maior sobre a inibição do crescimento do tumor. Estudos estão sendo realizados no momento para entender quais passagens estão envolvidas com a distribuição do hRS7 do SN-38 e como elas podem diferir do SN-38 livre, e que efeito o status de p53 pode ter nessa sinalização.

[00275] Os estudos de biodistribuição revelaram que o hRS7-CL2A-SN-38 teve absorção de tumor semelhante à do IgG hRS7 parental, mas depuraram substancialmente mais rápido com absorção hepática com 2 dobras a mais, o que pode ser devido à hidrofobicidade do SN-38. Com o ADC sendo depurado através do fígado, esperava-se que as toxicidades hepáticas e gastrointestinais fossem limitantes da dose. Embora os camundongos tivessem evidência de transaminases hepáticas elevadas, a toxicidade estava amena no melhor dos casos, apenas com perda de transiente no peso e sem anormalidades notadas na exameação histopatológica. Curiosamente, nenhuma toxicidade hematológica foi notada. Entretanto, os macacos mostraram um perfil idêntico de toxicidade àquele esperado para o irinotecano,

com toxidades gastrointestinal e hematológicas sendo limitantes de dose.

[00276] Visto que o TROP-2 reconhecido pelo hRS7 não é expresso em camundongos, foi criticamente importante executar estudos de toxidades em macacos que tivessem expressão de tecido semelhante àquelas de TROP-2 em humanos. Os macacos toleraram 0.96 mg/kg/dose ($\sim 12 \text{ mg/m}^2$) com toxicidade suave e reversível, o que extrapola uma dose humana de $\sim 0.3 \text{ mg/kg/dose}$ ($\sim 11 \text{ mg/m}^2$). Em uma experimentação clínica de fase I de NK012, os pacientes com tumores sólidos toleraram 28 mg/m² de SN-38 de 3 em 3 semanas com neutropenia de nível 4 como toxicidade limitante de dose (Hamaguchi et al., 2010, *Clin Cancer Res* 16:5058-66). De maneira semelhante, as experimentações clínicas de fase I com ENZ-2208 revelaram neutropenia febril limitante de dose, com uma recomendação para administrar 10 mg/m² de 3 em 3 semanas ou 16 mg/m² se G-CSF tiver sido administrado aos pacientes. Visto que os macacos toleraram uma dose cumulativa equivalente à humana de 22 mg/m², é possível que, embora o hRS7 se ligue a uma quantidade de tecidos normais, o MTD para um único tratamento do ADC hRS7 pudesse ser semelhante àquele de outros agentes SN-38 não-direcionantes. Com efeito, a especificidade do anticorpo anti-TROP-2 não pareceu ter desempenhado uma função na definição de DLT, pois o perfil de toxicidade foi semelhante àquele do irinotecano. Mais importante, se a atividade antitumor pudesse ser obtida em humanos, da mesma maneira que nos camundongos que responderam com dose equivalente à humana de apenas 0.03 mg de equivalentes/kg/doses de SN-38, então uma resposta antitumor significativa poderia ser realizada clinicamente.

[00277] Na conclusão, estudos de toxicologia em macacos, combinados com modelos de xenoenxerto de câncer humano *in vivo* em camundongos indicaram que esse ADC direcionado para TROP-2 é um

terapêutico efetivo em vários tumores de diferentes origens epiteliais.

Exemplo 12. Conjugado SN-38 anti-CD22 (Epratuzumabe) para Terapia de Malignidades Hematológicas

Resumo

[00278] Nós descobrimos anteriormente que anticorpos de internalização lenta conjugados com o SN-38 poderiam ser usados de maneira bem-sucedida quando preparados com um ligante que permitisse aproximadamente 50% do SN-38 de ligação com IgG para dissociar em soro a cada 24 horas. Neste estudo, a eficácia dos conjugados do SN-38 preparado com epratuzumad (internalizando rapidamente) e veltuzumabe (internalizando lentamente), anti-CD22 humanizado e IgG anti-CD20, respectivamente, foi examinada para o tratamento de malignidades de células B. Ambos os conjugados anticorpo–droga tiveram atividades nanomolares semelhantes contra uma variedade de linhas celulares de linfoma humano/leucemia, mas a liberação lenta de SN-38 comprometeu a discriminação de potência *in vitro* mesmo contra um conjugado irrelevante. Quando o SN-38 foi ligado de maneira estável ao conjugado anti-CD22, sua potência foi reduzida entre 40 e 55 dobras. Consequentemente, estudos adicionais foram conduzidos apenas com o ligante menos estável, de dissociação lenta. *In vivo*, atividade antitumor semelhante foi encontrada entre os conjugados anticorpo–droga CD22 e CD20 em camundongos portadores de xenoenxertos Ramos, ainda que Ramos expressasse 15 dobras a mais de CD20 do que de CD22, sugerindo que a internalização do conjugado epratuzumabe-SN-38 (Emab-SN-38) potencializou sua atividade. Emab-SN-38 foi mais eficaz do que um conjugado IgG-SN-38 sem ligação, irrelevante *in vivo*, eliminando uma maioria de xenoenxertos Ramos bem-estabelecidos em doses não-tóxicas. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o Emab-SN-38 poderia ser combinado com o veltuzumabe não-

conjugado para um tratamento mais eficaz. Assim, o Emab-SN-38 é ativo no linfoma e na leucemia a doses bem abaixo dos níveis tóxicos e, portanto, representa um novo agente promissor com potencial terapêutico isoladamente ou combinado com uma terapia com o anticorpo anti-CD20. (Sharkey et al., 2011, *Mol Cancer Ther* 11:224–34.)

Introdução

[00279] Um esforço significativo foi dedicado à terapia biológica de leucemia e linfoma, onde anticorpos não-conjugados (por exemplo, rituximabe, alemtuzumabe, ofatumumabe), radioimunoconjugados (⁹⁰Y-ibritumomabe tiuxetano, ¹³¹I-tositumomabe) e um conjugado de droga (gemtuzumabe ozogamicina) receberam a aprovação da U.S. Food and Drug Administration. Um outro conjugado anticorpo–droga (ADC), brentuximabe vedotina (SGN-35; anti-CD30-auristatina E), recebeu recentemente a aprovação acelerada pela FDA para linfoma Hodgkin e linfomas anaplásticos de célula grande. Há também uma quantidade de outros ADCs em desenvolvimento pré-clínico e clínico que têm como alvo CD19, CD22, CD37, CD74 e CD79b.

[00280] Os antibocorpos contra todos esses alvos são escolhar lógicas para transportadores de drogas, já que são internalizantes. A internalização e a especificidade de CD22 fizeram dele um alvo particularmente importante para leucemia e linfomas, com pelo menos 3 diferentes conjugados anti-CD22 em investigação clínica, incluindo CMC-544 (caliceamicina conjugada ácido-lábil), um conjugado anti-CD22-maitansina (ligado de maneira estável a MCC-DM1) e CAT-3888 (formalmente BL22; uma proteína de fusão de cadeia única de exotoxina de pseudomas). O agente ativo em todos esses conjugados tem potência subnanomolar (isto é, os chamados ultratóxicos).

[00281] Nós desenvolvemos recentemente métodos para conjugar anticorpos com SN-38, um inibidor do topoisomerase I com baixa potência

nanomolar que é derivado de uma pró-droga, irinotecano (Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62; Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Quatro elementos químicos de ligação de SN-38 foram inicialmente examinados utilizando conjugados preparados com um anticorpo anti-CEACAM5 de internalização lenta (Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62; Moon et al., 2008, *J Med Chem* 51:6916-26). Os conjugados retiveram a ligação de CEACAM5, mas diferiram na taxa de dissociação do SN-38 em soro humano, com meias-vidas variando entre aproximadamente 10 e 67 horas (Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-62). Finalmente, o ligante designado CL2, com estabilidade intermediária (~50% dissociado em 24–35 horas), foi selecionado para desenvolvimento adicional. O CL2 foi modificado recentemente, eliminando a fenilalanina no dipeptídeo clivável de catepsina B para simplificar e melhorar os rendimentos de fabricação. O novo derivado, designado CL2A, retém a ligação de carbonato sensível ao pH no SN-38, mas não encontra-se mais seletivamente clivado pela catepsina B. Não obstante, ele tem estabilidade de soro idêntica e atividade *in vivo* como o ligante CL2 original (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69). Visto que foi descoberta uma eficácia significativa sem a toxicidade com o anti-CEACAM5-SN-38 de internalização lenta, nós postulamos que a sua atividade foi ajudada pela liberação lenta de SN-38 a partir do anticorpo após ele ter se localizado em um tumor. Assim, o objetivo principal deste relatório era avaliar os prospectos terapêuticos dos conjugados preparados utilizando-se o ligante CL2A com dois anticorpos que são altamente específicos para cânceres de célula B, mas diferem em sua expressão de antígeno e em suas propriedades de internalização.

[00282] O epratuzumabe (Emab) é um IgG1 anti-CD22 com internalização rápida (por exemplo, ≥50% dentro de 1 hora), humanizada, que

foi extensivamente avaliado em linfoma e leucemia em uma forma conjugada e não-conjugada. O veltuzumabe (Vmab) é um anticorpo humanizado anti-CD20 que também está sendo estudado clinicamente, mas tem internalização lenta (por exemplo, ~10% em 1 hora). CD20 é expressado geralmente em níveis muito mais elevados do que CD22 em linfoma não-Hodgkin, enquanto o CD22 é expressado preferencialmente em leucemia linfoblástica aguda (ALL) mas não em mieloma múltiplo. Ambos os anticorpos são eficazes em pacientes como agentes não-conjugados, mas apenas o veltuzumabe é ativo em modelos de xenoenxerto de murina (Stein et al., 2004, *Clin Cancer Res* 10:2868-76). Com base em estudos anteriores que mostravam que o ⁹⁰Y-Emab combinado com o veltuzumabe não-conjugado potencializou a eficácia em modelos de NHL (Mattes et al., 2008, *Clin Cancer Res* 14:6154-60), nós também examinamos a combinação Emab-SN-38 + Vmab, visto que ela poderia oferecer benefícios adicionais sem competir pelo mesmo antígeno alvo ou ter toxicidade adicional.

Materiais e Métodos

[00283] Linhos celulares. Ramos, Raji, Daudi (linfomas de Burkitt), and JeKo-1 (linfoma de célula de manto) foram adquiridos com a American Type Culture Collection. REH, RS4; 11, MN-60 e 697 (ALL) foram adquiridos com a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. WSU-FSCCL (NHL folicular) foi presente do Dr. Mitchell R. Smith (Fox Chase Cancer Center, Filadélfia, PA). Todas as linhas celulares foram cultivadas em uma incubadora umidificada de CO₂ (5%) a 37°C em meios suplementados recomendados contendo de 10 a 20% de soro de feto de bezerro e foram verificados periodicamente para micoplasma.

[00284] Métodos de anticorpos e conjugação. O epratuzumabe e o veltuzumabe são anticorpos monoclonais humanizados de IgG1 anti-CD22 e anti-CD20, respectivamente. O labetuzumabe (Lmab), o IgG1 anti-CEACAM5

humanizado e o RS7, um anticorpo humanizado anti-TROP2 (ambos da Immunomedics, Inc.), foram usados como controles sem ligação, irrelevantes. Aqui, Emab-SN-38, Vmab-SN-38 e Lmab-SN-38 referem-se a conjugados preparados utilizando-se o ligante CL2A que foi descrito acima. *Estudos in vitro* em soro humano mostraram que aproximadamente 50% da meação de SN-38 ativo é liberada a partir de IgG a cada dia (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69). Outro ligante, designado CL2E, é estável em soro humano por 14 dias, mas ele contém um local de clivagem de catepsina B para facilitar a liberação de SN-38 quando processado em lisossomos. O método para preparar CL2E e as estruturas dos ligantes CL2A e CL2E são dados nos exemplos acima. Os conjugados continham aproximadamente 6 unidades de SN-38 por IgG (por exemplo, 1.0 mg do conjugado IgG-SN-38 contém ~16 µg de SN-38).

[00285] *citotoxicidade e ligação celular in vitro.* A citometria de fluxo foi realizada utilizando-se os anticorpos não-conjugados específicos e irrelevantes incubados por 1 hora a 4°C, com a ligação revelada utilizando-se um IgG anti-humano de bode específico de fragmento de (FITC)-Fcγ de isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch), também incubado por 1 hora a 4°C. A fluorescência mediana foi determinada em um citrômetro de fluxo FACSCALIBUR® (Becton Dickinson) que usa um pacote de software CellQuest.

[00286] A citotoxicidade foi determinada utilizando-se uma análise MTS de redução de tintura (Promega). Curvas de dose–resposta [com/sem Fcγ F(ab')₂ anti-humano de bode; Jackson ImmunoResearch] foram geradas a partir do meio de determinações triplicadas e os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando-se um software (v5) PRISM® GraphPad, com comparações estatísticas utilizando-se um teste F nas curvas mais aptas para os dados. A significância foi ajustada em P < 0.05.

[00287] Imunoblotting. Após uma exposição de 24 ou 48 horas aos agentes de teste, os marcadores de apoptose prévia (expressão p21) e tardia (clivagem PARP) foram relevados por blotting Western.

[00288] Estudos in vivo. O modelo subcutâneo de Ramos foi iniciado pelo implante de 1×10^7 células (0.2 mL) de cultivo (>95% de viabilidade) em camundongos nude fêmeas com 4 a 6 semanas de vida (Taconic). Três semanas a partir da implantação, os animais com tumores variando entre 0.4 e 0.8 cm³ (medido por compasso de calibre, L × D do × W) foram segregados em grupos de animais, cada um com a mesma escala de tamanhos de tumor. O tamanho do tumor e os pesos do corpo foram medidos pelo menos uma vez por semana, com os animais sendo removidos do estudo quando os tumores atingiram 3.0 cm³ ou se experimentaram perda de peso de corpo de 20% ou maior. Os modelos WSU-FSCCL e 697 intravenosos foram iniciados por injeção intravenosa de células de 2.5×10^6 e 1×10^7 , respectivamente, em camundongos fêmeas (Taconic) com imunodeficiência combinada severa (SCID). O tratamento começou 5 dias após a administração das células WSU-FSCCL e 7 dias após a inoculação 697. Os animais foram observados diariamente, utilizando paralisia da pata traseira ou outros sinais de morbidade como ponto final de sobrevivência do substituto. Todos os tratamentos foram dados intraperitonealmente em ≤0.2 mL. As dosagens específicas e a frequência são dadas da seção de Resultados. Visto que os camundongos convertem irinotecano para SN-38 de maneira eficiente, a dosagem de irinotecano foi ajustada com base nos equivalentes de SN-38; os equivalentes molares de SN-38 são baseados em massa de ADC de 1.6% e massa de irinotecano de 60%.

[00289] A eficácia foi expressa em uma curva Kaplan–Meier, usando tempo para progressão (TTP) como ponto final de sobrevivência do substituto,

conforme indicado acima. A análise estatística foi conduzida por um teste log-rank usando o software PRISM® GraphPad (significância, $P < 0.05$).

Resultados

[00290] Expressão de antígeno e citotoxicidade *in vitro*. Todas as linhas celulares eram altamente suscetíveis ao SN-38, com os valores de EC₅₀ de 0.13 nmol/L para Daudi a 2.28 nmol/L para RS4; 11 (tabela 9). À exceção de 697 e de RS4;11, o conjugado anti-CD22 Emab-SN-38 foi de 2 a 7 dobras menos eficaz do que o SN-38. Essa é uma descoberta comum em nossos conjugados SN-38 direcionado, assim como em outros não-direcionados. Apesar das diferenças na expressão do antígeno, o Emab-SN-38 e o Vmab-SN-38 tiveram potências semelhantes às do conjugado anti-CEACAM5 Lmab-SN-38 sem ligação, o que provavelmente deve-se à dissociação de aproximadamente 90% do SN-38 durante a análise MTS de 4 dias. Outros procedimentos *in vitro* usando tempos de exposição mais breves também foram ineficazes na discriminação de diferenças nas potências dos conjugados. Por exemplo, a Annexin V que manchou após uma exposição de 1 dia não obteve êxito na busca por diferenças entre as células tratadas e as não-tratadas (não mostrado). A regulação positiva de p21 e a clivagem de PARP também foram examinadas como marcadores prévios e tardios de apoptose, respectivamente. Ramos não expressou p21. Entretanto, a clivagem de PARP foi detectada, mas apenas após uma exposição de 48 horas, sendo expresso de maneira mais intensa nas células tratadas com SN-38 (não mostrado). A linha celular WSU-FSCCL expressou p21, mas nem a regulação positiva de p21 nem a clivagem de PARP ficaram evidentes antes de 48 horas após a exposição ao Emab-SN-38. Entretanto, ambos foram observados após uma exposição de 24 horas com o SN-38 livre (não mostrado). Quando a intensidade potencializada e a ativação prévia dos eventos apoptóticos com o SN-38 livre eram consistentes com seu

EC₅₀ mais baixo sobre a forma conjugada do IgG, os resultados indicaram que um período de exposição de no mínimo 48 horas seria necessário, mas desta vez aproximadamente 75% do SN-38 seria liberado a partir do conjugado.

Tabela 9. Expressão de CD20 e CD22 por FACScan e a citotoxicidade *in vitro* por análise MTS do SN-38 e dos conjugados específicos Emab anti-CD22–SN-38, Vmabanti-CD20–SN-38 e Lmab anti-CEACAM5–SN-38 contra diversas linhas celulares de tumores hematopoiéticos

Linha celular	Expressão de		SN-38, nmol/ L	valores ^a de EC ₅₀		
	CD20	CD22		Emab- 95% SN-38, nmol/ CI	Vmab- 95% SN-38, nmol/ CI	Lmab- 95% SN-38, nmol/ CI
NHL:Burkitt						
Raji	422,2 (6,8)	45,9 (6,8)	1,42	— 0,8 2,4	2,10 1,2– 3,8	ND
Ramos	620,4 (4,1)	40,8 (4,1)	0,40	— 0,2 0,7	2,92 2,2– 9,5 4,88	— 2,7– 9,0 3,73 1,8– 7,6
Daudi	815,1 (5,9)	145,0 (5,9)	0,13	— 0,1 0,2	0,52 0,4– 0,7	ND
NHL:folicular						
WSU-FSCCL	97,4 (4,9)	7,7 (4,9)	0,50	— 0,3 1,0	0,68 0,4– 1,1	ND
NHL:célula manto						
Jeko-1	604,6 (6,5)	11,2 (6,5)	ND	— 2,25	1,3– 3,8 1,98	1,1– 3,5 2,27 1,3– 3,9

Linha celular	Expressão de CD20		Expressão de CD22		valores ^a de EC ₅₀				
	Fluorescência mediana (fundo)	Fluorescência mediana (fundo)	SN-38, 95% nmol/L	Emab-Cl	Vmab-Cl	Lmab-Cl	SN-38, 95% nmol/L	SN-38, 95% nmol/L	SN-38, 95% nmol/L
ALL:célula B									
REH	12,3 (4,1)	22,9 (4,1)	0,47	— 0,9	1,22	0,8— 1,9	ND	— ND	—
697	6,9 (4,2)	16,0 (4,2)	2,23	— 3,9	2,67	1,7— 3,7	ND	— ND	—
RS4;1	3,7 (4,1)	23,3 (4,1)	2,28	— 4,9	1,68	1,0— 3,0	ND	— ND	—
MN-60	21,5 (5,8)	10,3 (5,8)	1,23	— 2,1	3,65	2,2— 6,2	ND	— ND	—

Abreviações: CI, intervalo de confiança; ND, não determinado. ^aEC₅₀ expresso como equivalentes molares de SN-38 em Emab-SN-38.

[00291] Nós examinamos de novo a clivagem de PARP e a expressão de p21, desta vez em célular tratadas com Emab-SN-38 + Vmab. Confirmando o estudo anterior em Ramos, a clivagem de PARP ocorre primeiramente apenas após uma exposição de 48 horas ao conjugado, com a expressão não-alterada na presença de um anticorpo de reticulação (não mostrado). A exposição a veltuzumabe por mais de 48 horas não teve efeito algum sobre a clivagem de PARP, mas a clivagem foi intensa dentro de 24 horas, quando foi adicionado um anticorpo de reticulação (não mostrado). Entretanto, quando o veltuzumabe sozinho (nenhum reticulador) foi combinado com o Emab-SN-38, a clivagem de PARP ocorreu após uma exposição de 24 horas (não mostrado), indicando que o veltuzumabe poderia induzir um início mais rápido da apoptose, mesmo na ausência de reticulação. A única diferença notável na

linha celular WSU-FSCCL foi que a combinação potencializou grandemente a expressão de p21 a 48 horas (não mostrado), sugerindo novamente uma aceleração da indução da apoptose quando o veltuzumabe é combinado com o conjugado Emab–SN-38. O atraso na indução de apoptose em WSU-FSCCL em comparação a Ramos deve-se provavelmente à expressão mais baixa de CD22 e CD20.

[00292] Os agentes ultratóxicos frequentemente utilizam ligantes que são altamente estáveis em soro, já que sua liberação prematura aumentaria a toxicidade, mas esses conjugados precisam ser internalizados para que a droga seja distribuída da maneira ideal. Visto que o epratuzumabe internaliza rapidamente, nós examinamos se ele pode se beneficiar de um SN-38 ligado de maneira mais estável em comparação à citotoxicidade *in vitro* do conjugado Emab–SN-38 ligado a CL2A com o conjugado com estabilidade de soro CL2E–SN-38. Ambos os conjugados tiveram uma afinidade de ligação semelhante (não mostrado), mas o Emab–CL2E–SN-38 mais estável era de aproximadamente 40 a 55 vezes menos potente do que o conjugado CL2A em 3 linhas celulares (não mostrado). Enquanto a especificidade estava em falta nos conjugados CL2A, o Emab–CL2E–SN-38 estava de maneira consistente duas vezes mais potente, aproximadamente, do que o conjugado Lmab–anti-CEACAM5–CL2E–SN-38 sem ligação (não mostrado). Nós concluímos que era improvável que o conjugado ligado de maneira mais estável fosse apropriado para um conjugado veltuzumabe de internalização lenta e, assim, continuamos nossa investigação apenas com conjugados SN-38 ligados a CL2A.

[00293] Por conta de limitações das análises *in vitro*, a eficácia foi avaliada em modelos de xenoenxerto. Como indicado na **tabela 9**, todas as linhas celulares do linfoma têm uma expressão muito maior de CD20 do que de CD22. Daudi teve a expressão mais elevada de CD22 e CD20, mas é muito

sensível *in vivo* ao veltuzumabe não-conjugado e um teste *in vitro* revelou a sensibilidade mais elevada ao SN-38 (**tabela 9**). Essas propriedades provavelmente tornariam difícil a avaliação das diferenças nas atividades atribuídas ao conjugado SN-38 contra o anticorpo não-conjugado, particularmente quando o epratuzumabe não-conjugado não é um terapêutico eficaz em animais. Visto que Ramos foi usado anteriormente para mostrar uma vantagem para combinar ⁹⁰Y-Emab com o veltuzumabe (Mattes et al., 2008, *ClinCancer Res* 14:6154-60), nós escolhemos começar com uma comparação dos conjugados Emab-SN-38 e Vmab-SN-38 na linha celular Burkitt humana de Ramos. Apesar de a citometria de fluxo mostrar uma expressão de 15 dobras a mais de CD20 em relação a CD22, a imunohistologia dos xenoenxertos de Ramos mostrou uma abundância de CD22 e de CD20, com CD22 aparentemente expresso de maneira mais uniforme do que CD20 (não mostrado).

[00294] Os xenoenxertos de Ramos em animais não-tratados progrediram rapidamente, atingindo um tamanho final de 3.0 cm³ a partir do seu tamanho inicial de 0.4 cm³ em 6 dias (não mostrado) e, como relatado anteriormente, nem o veltuzumabe nem o epratuzumabe afetaram de maneira notável a progressão dos xenoenxertos de Ramos bem estabelecidos (Sharkey et al., 2009, *J Nucl Med* 50:444-53). De maneira consistente com descobertas anteriores utilizando-se outros conjugados SN-38, nenhum dos animais tratados com um regime de tratamento de 4 semanas, duas vezes semanais, de 0.5 mg/dose tiveram uma perda de peso notável. Ambos os conjugados foram altamente eficazes no controle do crescimento do tumor, com 80% ou mais dos animais sem evidência alguma de tumor ao fim do tratamento de 4 semanas (**FIG. 6**). A dose de 0.25 mg do Vmab-SN-38 foi melhor no controle do crescimento pelas primeiras 4 semanas, mas em 0.5 mg um controle de

crescimento prévio semelhante foi observado para ambos os conjugados. Assim, apesar de uma expressão de 15 dobras a mais de CD20 em relação a CD22, o Emab-SN-38 assemelhou-se favoravelmente ao Vmab-SN-38. Consequentemente, os estudos restantes tiveram como foco o Emab-SN-38 sozinho ou em combinação com o veltuzumabe não-conjugado.

[00295] Dose–resposta do emab–SN-38 e especificidade. Uma relação dose–resposta foi vista nos conjugados específicos Emab–SN-38 e Lmab–SN-38 irrelevante, mas o Emab–SN-38 teve um controle de crescimento significativamente melhor em 2 dos 3 níveis testados, e com uma forte tendência em favor do conjugado específico na dose intermediária (**FIG. 7**). Novamente, 0.25 mg do Emab–SN-38 removeu a maioria dos tumores; aqui, 7 de 10 animais estavam livres de tumor ao fim do período de 12 semanas de monitoramento, sem alterações no peso. Os animais que receberam o irinotecano isoladamente (6.5 μ g/dose; aproximadamente os mesmos equivalentes de SN-38 como 0.25 de conjugado) tiveram uma sobrevida mediana de 1.9 semanas, com 3 dos 11 animais livres de tumor ao fim do estudo, o que não foi significativamente diferente da sobrevida mediana de 3.45 semanas para o conjugado Lmab–SN-38 irrelevante ($P = 0.452$; **FIG 7C**).

[00296] No modelo de leucemia disseminada com 697, a sobrevida mediana dos animais tratados com salina foi de apenas 17 dias a partir da inoculação do tumor. Os animais que receberam o epratuzumabe mais irinotecano (os mesmos equivalentes molares de SN-38 como 0.5 mg do conjugado) tiveram a mesma sobrevida mediana, enquanto os animais que receberam 0.5 mg do Emab–SN-38 duas vezes semanais, começando 7 dias a partir da inoculação do tumor, sobreviveram 24.5 dias, significativamente mais do que os animais que não foram tratados ($P < 0.0001$) ou para o epratuzumabe não-conjugado dado com irinotecano ($P = 0.016$). Entretanto, o

Emab-SN-38 não foi significativamente melhor do que o conjugado irrelevante (sobrevida mediana = 22 dias; $P = 0.304$), muito provavelmente refletindo a expressão mais de CD22 nessa linha celular.

[00297] Emab-SN-38 combinado com o anti-CD20 Vmab não-conjugado. Nós relatamos anteriormente respostas melhoradas quando o ^{90}Y -Emab foi combinado com o veltuzumabe não-conjugado no modelo subcutâneo (Mattes et al., 2008, *Clin Cancer Res* 14:6154-60) e assim essa possibilidade foi examinada com o Emab-SN-38. Em um estudo piloto, 5 animais portadores de tumores subcutâneos Ramos em uma média de aproximadamente 0.3cm^3 receberam veltuzumabe (0.1 mg), 0.1 mg de Emab-SN-38 ou Emab-SN-38 + Vmab (todos os agentes foram dosados duas vezes semanais por 4 semanas). O TTP mediano para 2.0 cm^3 era de 22, 14 e de mais de 77 dias, respectivamente (veltuzumabe contra Emab-SN-38 sozinho, $P = 0.59$; Emab-SN-38 + Vmab contra Emab-SN-38, $P = 0.0145$), fornecendo uma indicação inicial de que a combinação de veltuzumabe com Emab-SN-38 melhorou a resposta terapêutica como um todo. Em um estudo de acompanhamento que também utilizou um regime de tratamento de 4 semanas, duas vezes semanais, 6 de 11 animais receberam 0.1 mg do Emab-SN-38 mais 0.1 mg de veltuzumabe não apresentaram evidência de tumores nas 16 semanas a partir do início do tratamento, enquanto a sobrevida mediana para os animais que receberam o veltuzumabe isoladamente ou com 0.1 mg do Lmab-SN-38 de controle foi de 1.9 e 3.3 semanas, respectivamente, com 3 de 11 animais ficando livres de tumor em 16 semanas em cada um desses grupos (não mostrado). Apesar do TTP mediano mais longo e de mais sobreviventes, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos. Assim, no modelo de Ramos, que tem CD20 em abundância e níveis moderados de CD22, o conjugado Emab-SN-38 dado em níveis de dose não-tóxicos não foi

significativamente melhor do que a terapia anti-CD20 não-conjugado, mas a adição do Emab-SN-38 à terapia anti-CD20 não-conjugado aparentemente melhorou a resposta sem toxicidade. É importante enfatizar que os conjugados SN-38 receberam níveis bem abaixo de sua dose máxima tolerada e, assim, esses resultados não devem ser interpretados como se a terapia anti-CD20 conjugado fosse igual à do conjugado Emab-SN-38.

[00298] Dois estudos adicionais foram conduzidos em um modelo implantado intravenoso usando a linha celular NHL folicular WSU-FSCCL que tem uma expressão baixa de CD20 e de CD22 (não mostrado). O tempo de sobrevivência mediana para animais tratados com salina foi de 40 a 42 dias a partir da implantação do tumor. O irinotecano sozinho (não mostrado), dado a um dose contendo os mesmos equivalentes de SN-38 como 0.3 mg do ADC, aumentaram a sobrevivência mediana (49 contra 40 dias, respectivamente; $P = 0.042$), mas 14 de 15 animais sucumbiram à progressão da doença no dia 49, o mesmo dia em que os últimos 4 de 15 animais no grupo da salina foram eliminados (não mostrado). Apesar de sua expressão CD20 relativamente baixa, o veltuzumabe sozinho (35 µg, duas vezes semanais × 4 semanas) foi eficaz neste modelo. A sobrevivência mediana aumentou para 91 dias no primeiro estudo, com 2 curas (dia 161), e para 77 dias no segundo, mas com nenhum sobrevivente após 89 dias (veltuzumabe sozinho contra tratados com salina, $P < 0.001$ em ambos os estudos). O epratuzumabe não-conjugado (0.3 mg/dose) combinado com o irinotecano e o veltuzumabe teve a mesma sobrevivência mediana que o veltuzumabe sozinho, sugerindo que nem o epratuzumabe nem o irinotecano contribuíram para a resposta da rede.

[00299] Como esperado por conta da baixa expressão de CD22 por WSU-FSCCL, o emab-SN-38 sozinho não foi tão eficaz como em Ramos. Na dose de 0.15 mg, não foi visto nenhum benefício significativo sobre o grupo da

salina, mas em 0.3 mg, a sobrevivência mediana aumentou para 63 dias, proporcionando uma melhoria significativa em comparação aos animais tratados com salina ($P = 0.006$). O segundo estudo, usando 0.3 mg do Emab-SN-38, confirmou uma sobrevivência potencializada em comparação ao grupo da salina (75 contra 40 dias; $P < 0.0001$). A especificidade dessa resposta não foi aparente no primeiro estudo, onde a sobrevivência mediana do conjugado Lmab-SN-38 irrelevante e do Emab-SN-38 não foi diferente em níveis de dose de 0.15 ou 0.3 mg (42 contra 49 dias e 63 contra 63 dias para o Emab-SN-38 contra os conjugados anti-CEACAM5-SN-38 nos 2 níveis de dose, respectivamente). Entretanto, no segundo estudo, a dose de 0.3 mg do Emab-SN-38 forneceu uma sobrevivência significativamente melhorada em relação ao conjugado irrelevante (75 contra 49 dias; $P < 0.0001$). Novamente, a dificuldade em mostrar a especificidade nesse modelo provavelmente se relaciona à baixa expressão de CD22.

[00300] A combinação do Emab-SN-38 específico com veltuzumabe aumenta substancialmente a sobrevivência, com evidência de respostas mais fortes do que o Lmab-SN-38 de controle. Por exemplo, no primeiro estudo, os animais tratados com veltuzumabe mais 0.15 ou 0.3 mg do conjugado de controle tiveram uma sobrevivência mediana de 98 e 91 dias, respectivamente, que foi semelhante à do veltuzumabe sozinho (91 dias; não mostrado). Entretanto, o veltuzumabe mais 0.15 mg do conjugado específico Emab-SN-38 aumentou a sobrevivência mediana para 140 dias. Quando essa melhoria não foi significativamente mais elevada do que o veltuzumabe sozinho ($P = 0.257$), quando a dose do Emab-SN-38 foi aumentado para 0.3 mg com veltuzumabe, 6 de 10 animais permaneceram vivos ao fim do estudo, proporcionando uma significativa vantagem de sobrevivência em relação ao conjugado de controle mais o veltuzumabe ($P = 0.0002$). Em um segundo estudo, a sobrevivência

mediana do veltuzumabe sozinho foi mais curta do que no primeiro (77 contra 91 dias), contudo, a sobrevivência mediana para o conjugado de controle com veltuzumabe foi novamente de 91 dias, que renderam agora uma vantagem significativa de sobrevivência em relação ao veltuzumabe sozinho ($P < 0.0001$). A combinação do conjugado específico Emab–SN-38 com veltuzumabe estendeu a sobrevivência mediana para 126 dias, o que foi significativamente maior do que a sobrevivência mediana de 75 a 77 dias para o Emab–SN-38 e o veltuzumabe sozinho, respectivamente ($P < 0.0001$ para cada um). Entretanto, neste estudo, ela não atendeu às exigências de uma melhoria estatística em relação à combinação com o conjugado de controle anti-CEACAM5–SN-38 ($P = 0.078$).

Discussão

[00301] Ao longo dos últimos 10 anos, os ADCs obtiveram ganhos substanciais no tratamento do câncer, embora tenha havido alguns reveses. Os ganhos foram mais amplos quando os investigadores optaram por examinar agentes que eram demasiadamente tóxicos para serem usados sozinhos, mas quando acoplados a um anticorpo, esses chamados ultratóxicos produziram respostas substancialmente melhoradas nos testes pré-clínicos. A aprovação recente da vedotina de brentuximabe, um conjugado de auristatina, no linfoma de Hodgkin e o êxito clínico com o conjugado trastuzumabe–DM1 anti-HER2–maitansina como um agente único na refração do câncer para trastuzumabe não-conjugado sugerem que esses ADCs portadores de agentes ultratóxicos estão sendo aceitas como modalidades de tratamento. Entretanto, os conjugados preparados com agentes que são por si só potentes na escala picomolar podem ter um risco aumentado para toxicidade, como sugere a recente decisão de retirar do mercado a ozogamicina de gemtuzumabe, o conjugado anti-CD33–caliceamicina (Ravandi, 2011, *JClin Oncol* 29:349-51).

Assim, o sucesso de um ADC pode depender de identificar chemistries apropriados para ligar junto a droga e o antibody, assim como para definir um alvo apropriado que seja expresso suficientemente para permitir uma entrega adequada e seletiva do agente citotóxico.

[00302] Nós desenvolvemos um ligante para acoplar o SN-38 ao IgG que permite que o SN-38 seja liberado lentamente a partir do conjugado no soro (aproximadamente 50% por dia). Com este ligante, um anticorpo que seja lentamente internalizado poderia ser um terapêutico eficaz, talvez porque o conjugado localizado em um tumor libere uma quantidade suficiente da droga localmente, mesmo sem ser internalizado. O ligante CL2A também foi usado recentemente com um anticorpo para TROP-2, que foi reportado como rapidamente internalizado (Cardillo et al., 2011, *ClinCancer Res* 17:3157-69.). Assim, parece que o mecanismo de liberação lenta é benéfico para anticorpos internalizantes e não-internalizantes.

[00303] Neste relatório, nós expandimos nossa avaliação do ligante CL2A comparando os conjugados SN-38 preparados com epratuzumabe, um IgG anti-CD22 internalizante, veltuzumabe e um IgG anti-CD20 de internalização lenta para o tratamento das malignidades na célula B. Estudos prévios com a murina pai de epratuzumabe indicaram que a maioria dos anticorpos internaliza em 1 hora e 50% de CD22 é reexpresso na superfície celular em 5 horas (Shih et al., 1994, *Int J Cancer* 56:538-45). Esse processo de internalização e reexpressão permitiriam uma distribuição intracelular que poderia compensar a expressão de superfície mais baixa de CD22. Visto que muitas das malignidades da célula B expressam muito mais CD20 do que CD22, um conjugado direcionado para CD20 poderia distribuir mais moles da droga pela liberação de sua carga tóxica após ser localizado no tumor.

[00304] Os estudos *in vitro* de citotoxicidade não poderiam

discriminar a potência dos conjugados específicos ou mesmo um conjugado irrelevante por conta da liberação do SN-38 a partir do conjugado para dentro dos meios. Com efeito, o SN-38 sozinho foi ligeiramente mais potente do que os conjugados, o que pode refletir em sua habilidade acelerada de entrar na célula e incorporar a topoisomerase I. Visto que outros estudos revelaram que os conjugados requeriam uma exposição de 48 horas antes que os primeiros sinais de apoptose pudessem ser vistos, concluímos que a testagem *in vitro* não seria capaz de discriminar a potência desses 2 conjugados e assim recorremos aos estudos *in vitro*.

[00305] Em modelos de xenoenxerto, ambos os conjugados tinham atividades antitumor semelhantes contra os tumores de Ramos, que a citometria de fluxo indicou como expressada com aproximadamente 15 dobras a mais em CD20 do que em CD22. Isso conferiu apoio à seleção do conjugado Emab anti-CD22–SN-38, especialmente porque ele podia ser combinado com a terapia do Vmab anti-CD20 não-conjugado sem se preocupar se o agente interferiria na ligação do outro agente. Com efeito, se um conjugado anti-CD20–SN-38 fosse usado, a dose total de proteína do IgG total dada provavelmente ficaria abaixo de um nível normalmente necessário para tratamentos com anticorpos anti-CD20 não-conjugados efetivos, visto que a toxicidade limitante de dose seria conduzida pelo conteúdo do SN-38. A adição de mais anti-CD20 não-marcado a um conjugado anti-CD20–SN-38 traria o risco da redução da absorção do conjugado e potencialmente diminuiria a sua eficácia. Entretanto, como nós mostramos anteriormente nos estudos de combinação usando epratuzumabe radiomarcado com veltuzumabe não-conjugado, um benefício pode provir de ambos os agentes dados em suas dosagens máximas efetivas e seguras. *Estudos in vitro* mostraram que o veltuzumabe, mesmo na ausência da reticulação que é usada para potencializar a sinalização, aceleraram os eventos

apoptóticos iniciados com Emab-SN-38. Assim, já que o conjugado Emab-SN-38 foi eficaz como o conjugado anti-CD20, a seleção do conjugado Emab-SN-38 é uma escolha lógica, pois ele permite uma terapia de combinação mais eficaz, mesmo em tumores onde um dos ou ambos os抗ígenos tiveram expressão baixa.

[00306] Visto que a maioria dos ADCs utilizando drogas ultratóxicas estão ligados de maneira estável, nós também testamos um conjugado com estabilidade de soro, mas clivável intracelularmente, anti-CD22-SN-38, mas o teste determinou que ele era de 40 a 55 dobras menos potente do que o ligante CL2A. Outros examinaram uma variedade de drogas ultratóxicas conjugadas para anticorpos anti-CD20 ou anti-CD22, descobrindo que os conjugados internalizantes são geralmente mais ativos, mas também observando que mesmo os anticorpos de internalização lenta poderiam ser efetivos se a droga liberada penetrasse a membrana celular. Enquanto o ligante do tipo CL2A pode ser apropriado para o SN-38, ele pode não ser ideal para um agente mais tóxico, onde mesmo uma liberação pequena, sustentada, no soro aumentaria a toxicidade e comprometeria a janela terapêutica.

[00307] O emab-SN-38 era ativo a uma dose cumulativa de 0.6 mg nos camundongos portadores de Ramos (75 µg, duas vezes semanais, por 4 semanas), o que extrapola uma dose humana de apenas 2.5 mg/kg. Assim, o emab-SN-38 deve ter uma janela terapêutica nos pacientes. Além disso, uma dose eficaz e segura do conjugado anti-TROP-2-SN-38 foi combinada com uma dose máxima tolerada de um anticorpo ⁹⁰Y-marcado sem um aumento notável na toxicidade, mas com eficácia melhorada (Sharkey et al., 2011, *Mol Cancer Ther* 10:1072-81). Assim, a segurança e o perfil de eficácia desses conjugados de anticorpo SN-38 bastante favoráveis para outras terapias de combinação.

[00308] Ainda que o irinotecano não seja usado rotineiramente para

o tratamento de cânceres hematopoiéticos, o SN-38 foi tão potente em linhas celulares de linfoma e de leucemia quanto nos tumores sólidos (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69.). Na linha celular WSU-FSCCL, os conjugados IgG específicos e irrelevantes foram significativamente melhores do que o irinotecano, enquanto em Ramos, o TTP mediano com o conjugado irrelevante foi mais longo, mas não significativamente melhor do que o irinotecano. Esses resultados são consistentes com outros estudos que mostraram que um IgG não-específico é um excelente transportador para drogas e mais potente *in vivo* do que drogas livres ou conjugados preparados com albumina ou glicol de polietileno (PEG)-Fc. Quando o conjugado PEG-SN-38 teve efeitos antitumores significativos, ele foi dado em sua quantidade máxima tolerada, variando entre 10 e 30 mg/kg de equivalentes de SN-38 (Sapra et al., 2009, *Haematologica* 94:1456-9). Em contraste, a dose máxima cumulativa do SN-38 dada por 4 semanas a animais portadores de Ramos foi de apenas 1.6 mg/kg (isto é, dosagem de 0.25 mg de Emab-SN-38 dada duas vezes semanais por 4 semanas) e ela era não-tóxica.

[00309] A atividade terapêutica específica do Emab-SN-38 pareceu melhorar em linhas celulares com maior expressão de CD22. Por exemplo, em Ramos, os efeitos terapêuticos específicos do Emab-SN-38 sozinho foram registrados em 2 dos 3 diferentes níveis de dose examinados, e um número considerável de tumores foram completamente removidos. Em contraste, no WSU-FSCCL que teve expressão de aproximadamente 2.5 dobras a menos de CD22, o Emab-SN-38 melhorou a sobrevivência significativamente em comparação ao conjugado anti-CEACAM5-SN-38 irrelevante em 1 dos 2 estudos. Entretanto, é importante enfatizar que quando usado em combinação com a terapia de anti-CD20 não-conjugado, o Emab-SN-38 amplifica a resposta terapêutica. Assim, a combinação desses dois tratamentos poderia aumentar a

resposta, mesmo em situações onde o CD22 não é expresso de maneira elevada.

[00310] Em conclusão, usando o ligante CL2A–SN-28 menos estável, o conjugado Emab anti-CD22–SN-38 foi igualmente ativo em doses não-tóxicas *in vivo* como um conjugado anti-CD20–SN-38 semelhante, não obstante o fato de que a expressão de CD20 tenha sido mais do que uma dobra de registro maior do que CD22. As respostas terapêuticas foram beneficiadas pela combinação do emab–SN-38 com a terapia de Vmab anti-CD20 não-conjugado, mesmo quando a expressão de CD22 esteve baixa, sugerindo que a terapia de combinação poderia melhorar as respostas em uma quantidade de malignidades da célula B quando ambos os抗ígenos estivessem presentes. Os estudos atuais sugerem que essa combinação é muito potente em vários modelos pré-clínicos de linfoma e leucemia, embora pareçam ter menos toxicidade do hospedeiro.

Exemplo 13. Conjugados anti-CD74 (Milatuzumabe) SN-38 para o Tratamento de CD74 + Cânceres Humanos

Resumo

[00311] CD74 é um alvo atrativo para os conjugados anticorpo-droga (ADC), porque ele internaliza e recicla após a ligação de anticorpo. O CD74 é sobretudo associado a cânceres hematológicos, mas também é expresso em cânceres sólidos. Assim, a utilidade dos ADCs preparados com o anticorpo anti-CD74, Milatuzumabe, para tumores sólidos de terapia que expressam CD74 foi examinada. Milatuzumabe-doxorrubicina e os dois conjugados Milatuzumabe-SN-38 foram preparados com ligantes cliváveis (CL2A e CL2E), diferindo em sua estabilidade em soro e em como eles liberação o SN-38 no lisossomo. A expressão de CD74 foi determinada por citometria de fluxo e imunohistologia. A *citotoxicidade* *in vitro* e os estudos terapêuticos *in vivo* foram executados nas

linhas celulares humanas A-375 (melanoma), HuH-7 e Hep-G2 (hepatoma), Capan-1 (pancreática) e NCI-N87 (gástrica) e linfoma de Raji Burkitt lymphoma. O Milatuzumabe-SN-38 CAD foi comparado aos ADCs de SN-38 preparados com os anticorpos anti-TROP-2 e anti-CEACAM6 em xenoenxertos expressando seus抗ígenos-alvo.

[00312] O Milatuzumabe-doxorrubicina foi mais eficaz no modelo de linfoma, enquanto em A-375 e Capan-1 apenas o Milatuzumabe-CL2A-SN-38 apresentaram um benefício terapêutico. Apesar da expressão de superfície muito mais baixa de CD74 do que de TROP-2 ou CEACAM6, o Milatuzumabe-CL2A-SN-38 teve eficácia semelhante em Capan-1 como anti-TROP-2 CL2A-SN-38, mas no NCI-N87, os conjugados anti-CEACAM6 e anti-TROP-2 foram superiores. Os estudos em 2 linhas celulares de hepatoma em um nível de dose único mostrou um benefício significativo em relação a animais tratados com salina, mas não contra um conjugado IgG irrelevante. O CD74 é um alvo apropriado para ADCs em alguns xenoenxertos de tumores sólidos, com eficácia amplamente influenciada pela uniformidade da expressão de CD74 e com os conjugados de SN-38 ligados a CL2A proporcionando as melhores respostas terapêuticas.

Introdução

[00313] O CD74, referido como uma cadeia invariante ou II, é uma glicoproteína com transmembrana de tipo II que se associa com HLA-DR e inibe a ligação de peptídeos抗ígenicos para a estrutura de apresentação de抗ígeno de classe II. Ele serve como uma molécula de caperona, dirigindo os complexos de cadeia invariante para endossomos e lisossomos, uma molécula acessória na maturação das células B, usando uma passagem mediada por NF- κ B e nas respostas da célula T através de interações com CD44 (Naujokas et al., 1993, Cell74:257-68) e é um receptor para a citocina pró-inflamatória, fator

inibitório de migração de macrófago (Leng et al., 2003, *J Exp Med* 197:1467-76), que está envolvido na ativação da proliferação da célula em passagens de sobrevivência.

[00314] Em tecidos humanos normais, o CD74 é expresso primeiramente em células B, monócitos, macrófagos, células dentríticas, células Langerhans, subconjuntos de células T ativadas e epitélio tímido (não mostrad) e é expresso em mais de 90% dos tumores de célula B (Burton et al., 2004, *Clin Cancer Res* 10:6606-11; Stein et al., 2004, *Blood* 104:3705-11). Estudos prévios tinham dados conflitantes sobre se o CD74 está presente na membrana, em parte porque os anticorpos para a cadeia invariante eram específicos para a porção citoplasmica da molécula, mas também porque há relativamente poucas cópias na superfície e sua meia-vida na superfície celular é muito breve. Aproximadamente 80% do CD74 na superfície celular está associado com o HLA-DR de antígeno MHC II (Roche et al., 1993, *PNAS USA* 90:8581-85). Usando o anticorpo anti-CD74 de murine, LL1, estimou-se que a linha celular do linfoma de Raji Burkitt tivesse 4.8×10^4 cópias/células, mas por causa do rápido trânsito intracelular, $\sim 8 \times 10^6$ moléculas de anticorpo foram internalizadas e carbonizadas por dia (Hansen et al., 1996, *Biochem J* 320:293-300). Assim, a internalização de CD74 é altamente dinâmica, com o anticorpo sendo movido rapidamente da superfície e descarregado dentro da célula, seguido pela reexpressão de CD74 na superfície. O internalization de Fab' ocorre tão rapidamente quando a ligação do IgG, indicando que a ligação bivalente não é necessária. Estudos posteriores com uma versão enxertada com CDF de LL1 de murina, milatuzumabe (hLL1), descobriram que o anticorpo poderia alterar a proliferação, a migração e a expressão molecular de adesão da célula B (Stein et al., 2004, *Blood* 104:3705-11; Qu et al., 2002, *Proc Am Assoc Cancer Res* 43:255; Frolich et al., 2012, *Arthritis Res Ther* 14:R54), mas as

propriedades excepcionais de internalização do anticorpo anti-CD74 fizeram dele um transportador eficiente para a distribuição intracelular de substâncias terapêuticas para o câncer (por exemplo, Griffiths et al., 2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71). Baseado na eficácia pré-clínica e em resultados de toxicologia, as experiências clínicas de fase I com Milatuzumabe-doxorrubicina em múltiplos mielomas (Kaufman et al., 2008, *ASH Annual Meeting Abstracts*, 112:3697), assim como no linfoma não-Hodgkin e na leucemia linfocítica crônica, foram iniciadas.

[00315] Curiosamente, o CD74 também é expresso em cânceres não-hematopoiéticos, como cânceres gástricos, renais, bexida, pulmonares de célula não-pequena, certos sarcomas e glioblastoma (por exemplo, Gold et al., 2010, *Int J Clin Exp Pathol* 4:1-12) e, assim, ele pode ser um alvo terapêutico para tumores sólidos que expressam esse antígeno. Considerando-se que o conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina era altamente ativo em modelos de cânceres hematológicos, ele era uma escolha lógica para esta avaliação. Entretanto, nós desenvolvemos recentemente procedimentos para acoplar o inibidor altamente potente de topoisomerase I, SN-38, aos anticorpos. O SN-38 é a forma ativa do irinotecano, cujo metabolismo e farmacologia são bem conhecidos. Esses conjugados têm potência nanomolar em linhas celulares de tumores sólidos e descobriu-se que são ativos com os anticorpos que não foram internalizadosativamente. Estudos prévios indicaram uma preferência por um ligante (CL2A) que permitiram que o SN-38 se dissociasse do conjugado no soro com uma meia-vida de ~1 dia em vez de outros ligantes que eram ou mais ou menos estáveis em soro. Entretanto, dada a capacidade de internalização excepcional do Milatuzumabe, um novo ligante que é altamente estável em soro, mas que pode liberar SN-38 quando aplicado no lisossomo, foi desenvolvido.

[00316] A presente investigação examina os prospectos para uso desses três conjugados anti-CD74 de Milatuzumabe, um com doxorrubicina e dois conjugados de SN-38, para uma terapia eficaz primeirament econtra os tumores sólidos.

Materiais e Métodos

[00317] *Linhas celulares de tumores humanos.* As linhas celulares do linfoma de Raji Burkitt, doA-375 (melanoma), do Capan-1 (adenocarcinoma pancreático), do NCI-N87 (carcinoma gástrico), do Hep-G2 e do mieloma MC/CAR foram adquiridos com a American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). A linha celular do hepatoma de HuH-7 foi adquirida com o Japan Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japão). Todas as linhas celulares foram cultivadas em uma incubadora umidificada de CO₂ (5%) a 37°C em meios recomendados contendo de 10 a 20% de soro de feto de bezerro e suplementos. As células foram passadas <50 vezes e verificadas regularmente para ver se havia micoplasma.

[00318] *Métodos de anticorpos e conjugação.* O milatuzumabe (anti-CD74 MAb), o epratuzumabe (anti-CD22), o veltuzumabe (anti-CD20), o labetuzumabe (anti-CEACAM5), o hMN15 (anti-CEACAM6) e o hRS7 (anti-TROP-2) são anticorpos humanizados monoclonais de IgG₁. Os ligantes de CL2A e de CL2E e seus derivatidos de SN-38 foram preparados e conjugados para anticorpos, conforme descrito em Exemplos acima. Os conjugados Milatuzumabe-doxorrubicina foram preparados como descrito anteriormente (Griffiths et al., 2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71). Todos os conjugados foram preparados pela redução do bissulfeto do IgG, seguido pela reação com os derivados de maleimido correspondentes desses ligantes. As análises espectrofotométricas estimaram que a substituição molar droga:IgG foi 5-7 (1.0 mg da proteína contém ~16 µg do SN-38 ou 25 µg do equivalente de

doxorrubicina).

[00319] Citotoxicidade e ligação celular *in vitro*. As análises para comparar a ligação celular do milatuzumabe não-conjugado e conjugado às células positivas para antígeno e à testagem de citotoxicidade utilizaram o método de redução de tintura MTS (Promega, Madison, WI).

[00320] Citometria de fluxo e imunohistologia. A citometria de fluxo foi executada em uma maneira que proporcionou uma avaliação de um antígeno apenas ligado à membrana ou de membrana e citoplasmico. A imunohistologia foi executada em seções embutidas em parafina, fixado por formalina de xenoenxertos de tumor subcutâneo sem métodos de recuperação de antígeno, utilizando anticorpos a 10 µg/mL que foram revelados com um conjugado IgG anti-humano.

[00321] Estudos *in vivo*. Os camundongos nude fêmeas (4-8 semanas de idade) ou camundongos SCID fêmeas (7 semanas de idade) foram adquiridos com a Taconic (Germantown, NY) e usados após uma quarentena de 1 semana. Todos os agentes, incluindo controles de salina, foram administrados intraperitonealmente duas vezes semanais por 4 semanas. As doses específicas são fornecidas em Resultados. A toxicidade foi avaliada por medições semanais do peso. Para o modelo do linfoma de Raji Burkitt, os camundongos receberam injeções intravenosas de células Raji 2.5×10^6 em meios de 0.1 mL. Cinco dias depois, os animais receberam uma única injeção intravenosa (0.1 mL) do conjugado ou de salina (N = 10/grupo). Os camundongos foram observados diariamente para ver se havia sinais de aflição e paralisia e foram eutanasiados quando se desenvolveu a paralisia dos membros traseiros, >15% de perda do peso inicial, ou se ficaram moribundos de alguma outra maneira (pontos finais de sobrevivência do substituto).

[00322] Os tumores subcutâneos foram medidos pelo compasso de

calibre em duas dimensões, e o volume do tumor (TV) calculado como $L \times w^2/2$, onde L é o diâmetro mais longo e w é o mais curto. As medições foram feitas pelo menos uma vez por semana, com os animais sendo suprimidos quando os tumores atingiram 1.0 cm^3 (isto é, ponto final de sobrevivência do substituto). As linhas celulares de melanoma A-375 (células 6×10^6 em 0.2 mL) foram implantadas em um camundongo nude e a terapia foi iniciada quando os tumores apresentaram média de $0.23 \pm 0.06 \text{ cm}^3$ ($N = 8/\text{grupo}$). O Capan-1 foi implantado de maneira subcutânea nos camundongos nude usando uma combinação de suspensão de tumor dos tumores passados serialmente (0.3 mL de uma suspensão de tumor de 15% w/v) combinada com células 8×10^6 de um cultivo de tecido. Os tratamentos foram iniciados quando TV alcançou uma média de $0.27 \pm 0.05 \text{ cm}^3$ ($N = 10/\text{grupo}$). Os xenoenxertos de tumor gástrico NCI-N87 foram iniciados aplicando-se uma injeção subcutânea de 0.2 mL de uma mistura de matrigel de 1:1 (v/v) e células 1×10^7 de cultivo terminal. A terapia foi começada quando o TV alcançou a média de $0.249 \pm 0.045 \text{ cm}^3$ ($N = 7/\text{grupo}$). O mesmo procedimento foi seguido para desenvolver os xenoenxertos de hepatoma Hep-G2 e HuH-7 em camundongos nude. A terapia foi começada quando Hep-G2 alcançou a média de $0.364 \pm 0.062 \text{ cm}^3$ ($N = 5/\text{grupo}$) e HuH-7 alcançou a média de $0.298 \pm 0.055 \text{ cm}^3$ ($N = 5/\text{grupo}$).

[00323] A eficácia é expressa nas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, utilizando-se os pontos finais do substituto mencionados acima para determinar os tempos de sobrevivência mediana. A análise foi executada por teste de log-rank (Mantel-Cox) utilizando-se o software Prism GraphPad (LaJolla, CA), com significância a $P < 0.05$.

Resultados

[00324] Expressão de CD74 em linhas celulares de tumor humano e xenoenxertos. Seis linhas celulares derivadas de 4 tipos diferentes de tumores

sólidos foram identificadas como CD74-positivas com base primeiramente na análise de células permeabilizadas (**tabela 10**), visto que o MFI de CD74 apenas com membrana nas linhas celulares no tumor sólido com muita frequência foi < em mais de 2 dobras do que o MFI de fundo (exceto em linhas celulares de melanoma A-375). A expressão do CD74 de superfície em Raji foi > em mais do que 5 dobras do que as linhas celulares do tumor sólido, mas o CD74 total em células Raji permeabilizadas foi semelhante à maioria das linhas celulares do tumor sólido.

Tabela 10. Expressão de CD74 por citometria de fluxo expressada como intensidade fluorescente de meio (MFI) de células fechadas de Milatuzumabe-positivo.

Linha celular	Superfície		Superfície e citoplásmico	
	hLL1 (bkgd) ^a	Proporção de MFI hLL1:bkgd	hLL1 (bkgd) ^b	Proporção de MFI hLL1:bkgd
Panc CA ^c	Capan-1	22 (12)	1.8	248 (5)
	Hs746T	17 (8)	2.1	144 (5)
	NCI-N87	5 (4)	1.3	220 (6)
Gástrico	A-375	16 (3)	5.3	185 (6)
	Hep-G2	9 (6)	1.5	156 (5)
Melanoma	HuH-7	8 (5)	1.6	114 (4)
	Raji	59 (3)	19.6	143 (5)
Linfoma				

ND, não feito

^a Um fundo de MFI das células incubadas somente com GAH-FITC.

[00325] A imunohistologia mostrou que os xenoenxertos subcutâneos de Raji tinham uma coloração amplamente uniforme e intensa, com uma proeminente marcação da superfície celular (não mostrado). A linha celular do hepatoma Hep-G2 teve a absorção mais uniforme dos tumores sólidos, com coloração moderadamente forte, mas predominantemente citoplásica (não mostrado), seguida pela linha celular do melanoma A-375, que teve uma coloração um pouco menos uniforme com expressão mais

intensa, embora principalmente citoplasmica (não mostrado). As linhas celulares do carcinoma gástrico do Capan-1 pancreático (não mostrado) e do NCI-N87 (não mostrado) tiveram coloração CD74 de moderada (Capan-1) a intensa (NCI-N87), mas elas não estavam distribuídas uniformemente. A linha celular do hepatoma de HuH-7 (não mostrado) teve a coloração menos uniforme e mais fraca.

[00326] Imunorreatividade dos conjugados. Os valores de K_d para o milatuzumabe não-conjugado, o Milatuzumabe-CL2A e os conjugados CL2E-SN-38 não foram significativamente diferentes, tendo média de 0.77 nM, 0.59 nM e 0.80 nM, respectivamente. Os valores de K_d para o milatuzumabe não-conjugado e conjugado com doxorrubicina medido na linha celular do mieloma múltiplo MC/CAR foram de 0.5 ± 0.02 nM e 0.8 ± 0.2 nM, respectivamente (Sapra et al., 2008, *Clin Cancer Res* 14:1888-96).

[00327] Liberação *in vitro* da droga e estabilidades de soro dos conjugados. Os mecanismos de liberação de SN-38 dos ligantes CL2E e CL2A capeados com mercaptoetanol foram determinados em um ambiente que simulava parcialmente as condições lisossomais, a saber, pH baixo (pH 5.0), e na presença ou ausência de catepsina B. O substrato CL2E-SN-38 ficou inerte em pH 5 na ausência da enzima (não mostrado), mas na presença da catepsina B, a clivagem em um local Phe-Lys ocorreu rapidamente, com uma meia-vida de 34 min. (não mostrado). A formação do SN-38 ativo requer a ciclização intramolecular da ligação de carbamato na 10^a posição de SN-38, que ocorreu mais lentamente, com uma meia-vida de 10.7 h (não mostrado).

[00328] Conforme esperado, a catepsina B não teve efeito sobre a liberação do ativo SN-38 no ligante CL2A. Entretanto, o CL2A tem uma ligação clivável de benzil carbonato, liberando o ativo SN-38 a uma taxa semelhante à do ligante CL2E em pH 5.0, com uma meia-vida de ~10.2 h (não mostrado). O

conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina, que tem uma ligação de acilhidrazone sensível ao pH, teve uma meia-vida de 7 a 8 h a pH 5.0 (não mostrado).

[00329] Quando todos esses ligantes liberam a droga a taxas relativamente semelhantes sob condições lisossomicamente relevantes, eles têm estabilidades em soro muito diferentes. O Milatuzumabe-CL2A-SN-38 liberou 50% de SN-38 livre em 21.55 ± 0.17 h (não mostrado), consistente com outros conjugados CL2A-SN-38. O conjugado CL2E-SN-38, entretanto, era altamente inerte, com uma meia-vida extrapolada a ~ 2100 h. O conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina liberou 50% da doxorrubicina em 98 h, que foi semelhante a 2 outros anticorpo-doxorrubicina.

[00330] Citotoxicidade. Uma questão significativa relacionada à avaliação desses conjugados foi a relativa potência de doxorrubicina livre e de SN-38 nas linhas celulares do tumor sólido e hematopoiéticas. Nossa grupo relatou anteriormente que o SN-38 era ativo em diversos linfomas de célula B e linhas celulares de leucemia aguda, com potências variando entre 0.13 e 2.28 nM (Sharkey et al., 2011, *Mol Cancer Ther* 11:224-34). A potência de SN-38 em 4 das linhas celulares do tumor sólido que foram utilizadas posteriormente para estudos de terapia *in vivo* variou entre 2.0 e 6 nM (não mostrado). A doxorrubicina teve uma resposta mista, com 3-4 nM de potência no linfoma de Raji e nas linhas celulares do melanoma A-375, mas foi aproximadamente 10 vezes menos potente contra o Capan-1, o NCI-N87 e as linhas celulares Hep G2. Outros estudos comparando a potência do SN-38 à doxorrubicina descobriram: Câncer de cólon, 18 contra 18 (potência em nM do SN-38 contra doxorrubicina, respectivamente); câncer de mama MDA-MB-231, 2 contra 2 nM; câncer ovariano SK-OV-4, 18 contra 90 nM; adenocarcinoma pulmonar Calu-3, 32 contra 582 nM; câncer pancreático Capan-2, 37 contra 221 nM; e cancer de pulmão de célula pequena de NCI-H466, 0.1 contra 2 nM. Assim, SN-38 foi de 5

a 20 dobras mais potente do que a doxorrubicina em 4 dessas 6 linhas celulares, com potência semelhante em LS174T e MDA-MB-231. Coletivamente, esses dados indicam que a doxorrubicina é menos eficaz contra tumores sólidos do que o SN-38, enquanto o SN-38 parece ser igualmente eficaz em tumores sólidos e hematopoiéticos.

[00331] Conforme esperado, as 3 formas conjugadas foram frequentemente de alguma ordem de magnitude menos potente do que a droga livre *in vitro*, visto que se espera que ambas as drogas sejam imediatamente transportadas para dentro das células, enquanto os conjugados da droga necessitam da ligação do anticorpo para transportar a droga para dentro da célula (não mostrado). O conjugado SN-38 ligado a CL2A é uma exceção, visto que mais de 90% do SN-38 é liberado do conjugado para dentro dos meios ao longo do período de 4 dias de análise (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69; Sharkey et al., 2011, *Mol Cancer Ther* 11:224-34). Assim, mesmo se o conjugado foi internalizado rapidamente, não seria difícil discernir diferenças entre a droga livre e a droga ligada a CL2A.

[00332] O SN-38 estável ligado a CL2E teve uma execução comparativamente boa na linha celular de Raji, se comparado ao SN-38 livre, mas teve uma potência substancialmente mais baixa (de 7 a 16 dobras) nas linhas celulares dos 4 tumores sólidos, sugerindo que uma expressão de superfície relativamente baixa de CD74 pode estar exercendo influência na minimização do transporte da droga nesses tumores sólidos. O conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina teve diferenças substanciais em sua potência em comparação à doxorrubicina livre em todas as linhas celulares, que foi de magnitude semelhante à dos conjugados CL2E-SN-38 para o SN-38 livre nas linhas celulares do tumor sólido.

[00333] Nas 6 linhas celulares adicionais mencionadas acima, o

conjugado CL2A-SN-38 foi de 9 a 60 vezes mais potente do que o conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina (não mostrado), mas, outra vez, este resultado foi amplamente influenciado pelo fato de que o conjugado ligado a CL2A libera a maior parte do seu SN-38 nos meios ao longo do período de 4 dias de incubação, enquanto o conjugado de doxorrubicina liberaria no máximo 50% de sua droga durante esse mesmo período. O milatuzumabe ligado a CL2E não foi examinado nessas outras linhas celulares.

[00334] Terapia *in vivo* de xenoenxertos de tumor humano. Estudos *in vivo* anteriores com os conjugados Milatuzumabe-doxorrubicina ou SN-38 preparados com vários anticorpos indicaram que eles foram eficazes em doses bem menores do que sua dose máxima tolerada (Griffiths et al., 2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71; Sapra et al., 2005, *Clin Cancer Res* 11:5257-64; Govindan et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15:6052-61; Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69; Sharkey et al., 2011, *Mol Cancer Ther* 11:224-34), com isso, a testagem *in vivo* teve como foco a comparação de quantidades semelhantes, porém fixas, de cada conjugado a níveis que eram bem tolerados.

[00335] Os estudos iniciais examinaram primeiramente os conjugados de doxorrubicina e SN-38 em modelos disseminados Raji do linfoma para avaliar o conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina em comparação aos 2 conjugados de SN-38 (não mostrado). Todos os conjugados específicos foram significativamente melhores do que o conjugado não-direcionante labetuzumabe-SN-38 ou os animais tratados com salina, os quais tiveram uma sobrevivência mediana de apenas 20 dias ($P < 0.0001$). Apesar de os estudos *in vitro* indicarem uma vantagem de até 8 dobras para os conjugados de SN-38 em Raji, a melhor sobrevivência foi observada com os conjugados Milatuzumabe-doxorrubicina, em que todos os animais que receberam uma dose única de 17.5 mg/kg (350 µg) e 7/10 dos animais que receberam 2.0

mg/kg (40 µg) vivos na conclusão do estudo (dia 112) (por exemplo, dose de 17.5 mg/kg de Milatuzumabe-doxorrubicina contra Milatuzumabe-CL2A-SN-38, $P = 0.0012$). A sobrevivência foi significativamente mais baixa para os conjugados CL2E-SN-38 mais estáveis ($P < 0.0001$ e $P = 0.0197$, doses de 17.5 e 2.0 mg/kg para o CL2A contra CL2E, respectivamente), embora estudos *in vitro* sugerissem que ambos os conjugados liberariam SN-38 ativo a taxas semelhantes quando fossem internalizados.

[00336] Cinco linhas celulares de tumor sólido foram examinadas, começando com a linha celular do melanoma A-375, visto que ele tinha a melhor resposta *in vitro* tanto para a doxorrubicina quanto para o SN-38. Os xenoenxertos A375 cresceram rapidamente, com os animais de controle tratados com salina tendo uma sobrevivência mediana de apenas 10.5 dias (não mostrado). Uma dose de duas vezes semanais de 12.5 mg/kg (0.25 mg por animal) do conjugado Milatuzumabe-CL2A-SN-38 estendeu a sobrevivência para 28 dias ($P = 0.0006$), o que foi significativamente melhor do que o conjugado de controle epratuzumabe-CL2A-SN-38 com uma sobrevivência mediana de 17.5 dias ($P = 0.0089$), com este último não sendo significativamente diferente dos animais tratados com salina ($P = 0.1967$). O conjugado Milatuzumabe-CL2A proporcionou uma sobrevivência significativamente mais longa do que o conjugado Milatuzumabe-CL2E-SN-38 ($P = 0.0014$), que teve a mesma sobrevivência mediana de 14 dias que o seu conjugado de controle epratuzumabe-CL2E-SN-38. Apesar de dar uma dose de 2 dobras a mais do Milatuzumabe-doxorrubicina do que dos conjugados de SN-38, a sobrevivência mediana não foi melhor do que a dos animais tratados com salina (10.5 dias).

[00337] Como com o modelo do melanoma A-375, em Capan-1, somente o conjugado de SN-38 ligado a CL2A foi eficaz, com uma sobrevivência

mediana de 35 dias, significativamente diferente dos animais não-tratados ($P < 0.036$) (não mostrado), mesmo em uma dose mais baixa (5 mg/kg; 100 µg por animal) ($P < 0.02$). Nem o Milatuzumabe-CL2E nem os conjugados não-direcionantes epratuzumabe-CL2A-SN-38, ou uma dose com 2 dobras a mais do conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina, proporcionou uma vantagem de sobrevivência ($P = 0.44$ contra salina). É digno de nota que no mesmo estudo com animais que receberam a mesma dose do conjugado internalizante anti-TROP-2 CL2A-SN-38 (hRS7-SN-38; IMMU-132), a sobrevivência mediana foi igual à do Milatuzumabe-CL2A-SN-38 (não mostrado). O conjugado hRS7-CL2A-SN-38 foi identificado anteriormente como um ADC de interesse para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69). O MFI para o hRS7 de ligação de superfície em Capan-1 foi 237 (não mostrado), comparado a 22 para o milatuzumabe (ver **tabela 10**). Assim, apesar de ter uma expressão de antígeno de superfície substancialmente mais baixa, os conjugados Milatuzumabe-CL2A-SN-38 tiveram uma execução tão boa quanto o conjugado hRS7-CL2A-SN-38 nesse modelo.

[00338] Com o conjugado do Milatuzumabe-doxorrubicina tendo resultados terapêuticos inferiores em 2 dos xenoenxertos de tumor sólido, o foco mudou para a comparação dos conjugados Milatuzumabe-SN-38 com os conjugados SN-38 preparados com outros anticorpos humanizados contra TROP-2 (hRS7) ou CEACAM6 (hMN-15), os quais são expressos de maneira mais significativa na superfície de vários tumores sólidos (Blumenthal et al., 2007, *BMC Cancer* 7:2; Stein et al., 1993, *Int J Cancer* 55:938-46). Três modelos adicionais do xenoenxerto foram examinados.

[00339] No modelo do tumor gástrico, NCI-N87, os animais que receberam 17.5 mg/kg/dose (350 µg) do Milatuzumabe-CL2A-SN-38

proporcionaram certa melhora na sobrevivência, mas não conseguiu satisfazer uma significância estatística em comparação aos animais tratados com salina (31 contra 14 dias; $P = 0.0760$) ou ao conjugado anti-CD20-CL2A-SN39 veltuzumabe não-ligante (21 dias; $P = 0.3128$) (não mostrado). Entretanto, os conjugados hRS7- e hMN-15-CL2A melhoraram significativamente a sobrevivência mediana para 66 e 63 dias, respectivamente ($P = 0.0001$). O MFI para o TROP-2 expresso em superfície e o CEACAM6 foram de 795 e 1123, respectivamente, muito maior do que o CD74, que foi de apenas 5 (ver **tabela 10**). A imunohistologia mostrou uma expressão citoplasmica relativamente intensa de CD74 no xenoenxerto dessa linha celular, mas, de maneira importante, ele foi dispersado aparecendo apenas em bolsos definidos dentro do tumor (não mostrado). O CEACAM6 e o TROP-2 foram expressos de maneira mais uniforme do que CD74 (não mostrado), com o CEACAM6 estando presente de maneira mais intensa tanto citoplasmicamente e sobre a membrana, e o TROP-2 primeiramente encontrado sobre a membrana. Assim, a sobrevivência melhorada com os conjugados anti-CEACAM6 e anti-TROP-2 provavelmente reflete a maior densidade do antígeno e a expressão mais uniforme em NCI-N87.

[00340] Na linha celular do hepatoma Hep-G2 (não mostrado), a imunohistologia apresentou uma expressão muito uniforme com coloração citoplasmica moderada de CD74, e a citometria de fluxo indicou uma expressão de superfície relativamente baixa (MFI = 9). O MFI com hMN-15 foi de 175 e a imunohistologia apresentou uma membrana razoavelmente uniforme e uma expressão citoplasmica de CEACAM6, com bolsos isolados de coloração de membrana bastante intensa (não mostrado). Um estudo em animais portadores de xenoenxertos Hep-G2 descobriu que o Milatuzumabe-CL2A-SN-38 estende a sobrevivência para 45 dias em comparação aos 21 dias no grupo

tratado com salina ($P = 0.0048$), enquanto o conjugado hMN-15-CL2A-SN-38 aumentou a sobrevivência para 35 dias. Houve uma tendência favorecendo o conjugado de milatuzumabe sobre o hMN-15-CL2A-SN-38, mas ele não conseguiu alcançar uma significância estatística (46 contra 35 dias; $P = 0.0802$). Entretanto, o conjugado veltuzumabe-CL2A-SN-38 não-ligante proporcionou uma vantagem de sobrevivência semelhante à do conjugado de Milatuzumabe. Nós observamos anteriormente que os resultados terapêuticos com os conjugados não-ligantes poderiam ser semelhantes às do conjugado específico ligado a CL2A, particularmente em doses de proteínas maiores, mas a titulação dos conjugados de controle e específico normalmente revelou-se de maneira seletiva. Assim, nenhum dos conjugados específicos proporcionou uma vantagem terapêutica seletiva nessa linha celular a essas doses.

[00341] Um outro estudo utilizando a linha celular do hepatoma HuH-7 (não mostrado), que tinha expressão de superfície semelhante, mas níveis citoplásmicos ligeiramente inferiores como Hep-G2 (veja a **tabela 10**), descobriu que o conjugado hMN-15-SN-38 fornece uma vantagem de sobrevivência mais longa (35 contra 18 dias), ainda que não significativamente diferente, do que o conjugado Milatuzumabe-CL2A ($P = 0.2944$). Quando os conjugados hMN-15 e os de milatuzumabe foram significativamente melhores do que os animais tratados com salina ($P = 0.008$ e 0.009 , respectivamente), outra vez, nenhum conjugado foi significativamente diferente do conjugado não-direcionado veltuzumabe-SN-38 nesse nível de dose ($P = 0.4602$ e 0.9033 , respectivamente). A expressão de superfície de CEACAM6 foi relativamente baixa nessa linha celular (MFI = 81) e a imunohistologia mostrou que tanto o CD74 (não mostrado) quanto o CEACAM6 (não mostrados) estavam muito fracos e altamente dispersos.

Discussão

[00342] A abordagem com o conjugado anticorpo-droga (ADC) para a quimioterapia seletiva de tumor é uma área de considerável interesse atualmente (por exemplo, Govindan et al., 2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:873-90; Sapra et al., 2011, *Expert Opin Biol Ther* 20:1131-49. Os sucessos clínicos recentes (Pro et al., 2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:1415-21; LoRusso et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:437-47) deram-se em grande parte com a adoção de drogas supertóxicas no lugar dos agentes quimioterapêuticos convencionais que haviam sido usados anteriormente. Entretanto, a seleção do alvo, o anticorpo e o ligante da droga são todos fatores que influenciam na execução ideal de um ADC. Por exemplo, no caso do trastuzumabe-DM1, o HER2 é abundante nos tumores que expressam esse antígeno, o anticorpo é internalizado e o próprio anticorpo apresenta atividade anti-tumor, e todos eles poderiam ser combinados para potencializar o resultado terapêutico. Em contraste total, o CD74 é expresso em um nível muito mais baixo na superfície das células, mas sua internalização única e suas propriedades de reexpressão de superfície permitiram que um ADC anti-CD74 milatuzumabe fosse efetivo em modelos de xenoenxerto de câncer hematopoiético mesmo com uma droga moderadamente tóxica, como a doxorrubicina (Griffiths et al., 2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71; Sapra et al., 2005, *Clin Cancer Res* 11:5257-64). Embora a doxorrubicina seja usada com mais frequência em cânceres hematopoiéticos, enquanto o SN-38 e outras camptotecinas são administradas em pacientes com tumores sólidos, nós decidimos avaliar a utilidade da doxorrubicina e dos conjugados SN-38 do milatuzumabe em tumores sólidos. O conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina foi eficaz em modelos de xenoenxerto de vários cânceres hematológicos, levando à sua testagem clínica (NCT01101594 e NCT01585688), enquanto diversos conjugados SN-38 foram eficazes em modelos de tumores sólidos e hematológicos, fazendo com que 2 novos

conjugados SN-38 fossem buscados nas experimentações clínicas de fase I de câncer colorretal e diversos cânceres epiteliais (NCT01270698 e NCT01631552).

[00343] *In vitro*, a doxorrubicina não-conjugada e o SN-38 tiveram potência semelhante à doxorrubicina contra a linha celular do linfoma de Raji, mas o SN-38 foi mais potente em uma quantidade em diferentes linhas celulares do tumor sólido. Curiosamente, *in vivo*, o conjugado Milatuzumabe-doxorrubicina proporcionou a melhor resposta em Raji em comparação aos conjugados Milatuzumabe-SN-38. Entretanto, em Capan-1 e em A-375, o Milatuzumabe-doxorrubicina foi menos efetivo do que o conjugado ligado a CL2A de milatuzumabe SN-38, ainda que a testagem *in vitro* tenha indicado que o A-375 foi igualmente sensível à doxorrubicina livre e ao SN-38 livre. Duas outras linhas celulares, o câncer de mama MDA-MB-231 e o câncer de cólon LS174T, também tiveram potência semelhante com a doxorrubicina e com o SN-38 *in vitro*, mas visto que a testagem *in vitro* indicou que o SN-38 foi igualmente efetiva em cânceres sólidos e hematológicos, e com o SN-38 tendo uma potência de 5 a 20 dobras a mais do que a doxorrubicina na maioria das linhas celulares de tumores sólidos avaliadas, nós decidimos manter o foco nos 2 conjugados Milatuzumabe-SN-38 para a terapia do tumor sólido. Entretanto, para melhorar calibrar a utilidade dos conjugados Milatuzumabe-SN-38, nós incluímos uma avaliação comparativa para os ADCs de SN-38 preparada com anticorpos contra outros抗ígenos que estão presentes em uma variedade de tumores sólidos.

[00344] Nós tínhamos investigado anteriormente as respostas terapêuticas com o conjugado de SN-38 ligado a CL2A anti-TROP-2 hRS7 na linha celular de Capan-1 (Cardillo et al., 2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69), e assim as eficácia do milatuzumabe e dos conjugados SN-38 hRS7 foram comparadas. Neste estudo, ambos os conjugados melhoraram

significativamente a sobrevivência em comparação aos anticorpos de controle, com os conjugados de SN-38 ligado a CL2A de cada um sendo superior aos conjugados ligados a CL2E. Visto que a citometria de fluxo indicou que a expressão de TROP-2 foi maior do que o CD74 em Capan-1, esse resultado sugeriu que as capacidades de transporte do CD74, sabidamente excepcionais, foram mais eficazes do que TROP-2. Entretanto, é bem sabido que a acessibilidade do antígeno (isto é, membrana contra citoplasma, barreiras fisiológicas e de "local de ligação") e a distribuição entre as células dentro de um tumor são fatores críticos que influenciam toda forma de terapia direcionada, especificamente aquelas que dependem de uma distribuição intracelular adequada de um produto em células individuais (Thurber et al., 2008, *Adv Drug Del Rev* 60:1421-34). Nas situações onde o antígeno não é expressado uniformemente em todas as células dentro do tumor, ter um agente direcionado que liberasse lentamente sua carga após localizar o tumor, com os conjugados ligados a CL2A, permitiria que a droga se difundisse em células espectadoras não-direcionadas, potencializado assim a sua escala de eficácia. Com efeito, a expressão elevada do antígeno poderia potencialmente impedir a penetração do tumor pelo efeito barreira do local de ligação, mas o mecanismo de liberação extracelular poderia proporcionar um mecanismo para que a droga se difundisse dentro do tumor. Esse mecanismo também é pensado para ajudar na eficácia de outros conjugados que nós examinamos utilizando anticorpos escassamente internalizantes, como o anti-CEACAM5 e o anti-CEACAM6 aqui utilizados. Os conjugados baseados no milatuzumabe dependem de maneira mais intensa na interação direta do anticorpo com a célula do tumor, tirando vantagem da internalização rápida de CD74 e da reexpressão que pode compensar a sua menor abundância na superfície das células. Entretanto, essa vantagem seria mitigada quando o CD74 estivesse

altamente disperso dentro do tumor, e sem um mecanismo para reter o conjugado dentro do tumor, o benefício da liberação lenta da droga a partir do conjugado seria perdido. Uma revisão anterior dos tumores humanos gastrointestinal pelo nosso grupo sugere que eles frequentemente têm um elevado nível de expressão com boa uniformidade (Gold et al., 2010, *Int J Clin Exp Pathol* 4:1-12).

[00345] Durante a nossa avaliação inicial dos ligantes apropriados para o SN-38, uma quantidade de derivados diferentes foi examinada, incluindo um ligante semelhante a 'CL2E' que foi projetado para ser acoplado à posição 20-hidroxil do SN-38, semelhante ao ligante CL2A. Entretanto, esse conjugado de anticorpo careceu de atividade antitumor suficiente e não foi buscado. Dadas as propriedades excepcionais de internalização do Milatuzumabe, nós decidimos revisitá-los os elementos químicos do ligante SN-38, com a hipótese de que a internalização de um conjugado de CD74 potencializaria o carregamento da droga de um conjugado mais estável. Nós depreendemos que se o grupo de saída fosse fenólico, isso promoveria uma ciclização e, assim, o ligante de CL2E foi projetado para se unir ao SN-38 de posição 10 fenólico.

[00346] No início, o conjugado de SN-38 ligado a CL2E tinha um IC₅₀ promissoramente semelhante ao conjugado de CL2A na linha celular de Raji, o que era consistente com a noção de que, se rapidamente internalizados, ambos os conjugados liberariam a forma ativa de SN-38 praticamente na mesma taxa. Entretanto, conforme já mencionado, a atividade *in vitro* do conjugado de CL2A é amplamente influenciada pela liberação do SN-38 nos meios e não necessariamente reflete a absorção pelo conjugado intacto. Quando descobriu-se que o conjugado ligado a CL2E é muito menos potente em células de tumor sólido do que o conjugado de CL2A, isso sugeriu que a expressão de superfície

mais baixa do CD74 afetava a internalização do SN-38 através da ligação de Milatuzumabe. Entretanto, quando os estudos *in vivo* em Raji mostraram que o Milatuzumabe-CL2A-SN-38 era superior ao conjugado de CL2E, algum outro fator que afetaria a eficácia de CL2E teve que ser considerado. Uma explicação possível é que o projeto do ligante no CL2E-SN-38 deixa a posição 20 da droga não-derivatizada, deixando o grupo lactona suscetível à abertura de anel. Com efeito, os estudos com o irinotecano mostraram que a potência do SN-38 é diminuída por uma quantidade de fatores, com a abertura de anel da lactona para a forma do carboxilato possuindo apenas 10% da potência da forma intacta da lactona. Em contraste, o SN-38 ligado a CL2A é derivatizado na posição 20-hidroxil um processo que estabiliza o grupo lactona em camptotecinas sob condições fisiológicas. Assim, o anel de lactona do SN-38 é provavelmente protegido de clivagem no CL2A, mas não o conjugado de CL2E. Assim, a desestabilização do anel de lactona pode ter contribuído para a eficácia diminuída de CL2E *in vivo*. Visto que os estudos de estabilidade *in vitro* e a análise da estabilidade do soro foram executados sob condições acídicas, nós não temos uma medida direta da forma de carboxilato do SN-38 em nenhum desses conjugados.

[00347] Em conclusão, os resultados *in vitro* e *in vivo* indicam que o conjugado do Milatuzumabe-doxorrubicina é superior ao conjugado CL2A-SN-38 na linha celular do linfoma de Raji, o que pode refletir a estabilidade melhorada do conjugado de doxorrubicina em comparação àquele de CL2A. Entretanto, a descoberta de que o conjugado CL2A-SN-38 era mais eficaz do que o conjugado CL2E-SN-38 altamente estável sugere que outras questões, potencialmente relacionadas à ativação da droga ou às sensibilidades da linha celular, podem ter alguma influência.

[00348] O CD74 tem papéis múltiplos na biologia da pilha; em células

que apresentam antígeno, ela pode ter uma função mais dominante no processamento de peptídeos antigênicos, onde ele é tumores sólidos, seu papel pode estar mais relacionado à sobrevivência. Essas diferentes funções podem afeitar o tráfego e o processamento intracelulares. Alternativamente, a menor eficácia do SN-38 ligado a CL2E pode refletir a inativação da droga pela abertura de anel da lactona no SN-38, implicando a importância do ligante específico. Finalmente, nos modelos de tumor sólido, a acessibilidade do antígeno parece ter um papel dominante na definição da potência do Milatuzumabe-CL2A-SN-38 quando medido contra conjugados preparados com outros anticorpos internalizantes (hRS7) ou escassamente internalizantes (hMN15) que estavam mais acessíveis (expressos na superfície) e abundantes. Nós suspeitamos que essa descoberta é universal para terapias direcionadas, mas esses estudos mostraram, no mínimo, que as propriedades únicas de internalização de um agente direcionado a CD74 pode proporcionar uma eficácia significativa mesmo quando a expressão de superfície do antígeno alvo for mínima.

Exemplo 14. Uso do hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar o câncer colônico metastático refrativo a terapia (mCRC)

[00349] O paciente era uma mulher de 62 anos com mCRC que originalmente apresentou a doença metastática em janeiro de 2012. Ela teve colectomia transversa ileal laparoscópica como primeira terapia, algumas semanas após o diagnóstico, e então recebeu 4 ciclos de quimioterapia com FOLFOX (leucovorina, 5-fluorouracil, oxaliplatina) em uma configuração neoadjuvante antes da hepatectomia direita em março de 2012 para remoção das lesões metastáticas no lóbulo direito do fígado. A isso seguiu-se um regime adjuvante FOLFOX que recomeçou em junho de 2012, para um total de 12 ciclos de FOLFOX. Em agosto, a oxaliplatina foi retirada do regime devido à

piora na neurotoxicidade. Seu último ciclo de 5-FU foi em 25/09/12.

[00350] O CT feito em janeiro de 2013 mostrou metástase no fígado. Ela então foi avaliada como uma boa candidata para participar do estudo investigativo de IMMU-132 (**hRS7-SN-38**). As comorbidades em seu histórico médico incluíam asma, diabetes mellitus, hipertensão, hipercolesterolemia, sopro cardíaco, hérnia de hiato, hipotiroidismo, síndrome do túnel carpal, glaucoma, depressão, síndrome das pernas inquietas e neuropatia. Seu histórico cirúrgico incluía ligação tubária (1975), tiroidectomia (1983), colecistectomia (2001), liberação do túnel carpal (2008) e cirurgia de glaucoma.

[00351] No momento de ingresso nessa experimentação, sua lesão alvo era um tumor de 3.1 cm no lóbulo esquerdo do fígado. As lesões não-direcionadas incluíam diversas massas hipoatenuadas no fígado. Sua linha de base CEA era de 781 ng/m.

[00352] Após a paciente ter assinado o consentimento informado, o IMMU-132 foi dado em um cronograma de uma vez por semana através de infusão por 2 semanas consecutivas, em seguida, um descanso de uma semana, constituindo um ciclo de tratamento. Esses ciclos foram repetidos conforme tolerados. A primeira infusão de IMMU-132 (8mg/kg) foi iniciada em 15 de fevereiro de 2013 e concluída sem eventos notáveis. Ela apresentou náusea (nível 2) e a fadiga (nível 2) durante os cursos do primeiro ciclo e tem continuado o tratamento desde então sem grandes eventos adversos. Ela relatou alopecia e constipação em março de 2013. A primeira avaliação de resposta feita (após 6 doses) em 08/04/2013 mostrou um encolhimento da lesão alvo em 29% por tomografia computada (CT). Seu nível de CEA diminuiu a 230 ng/ml em 25 de março de 2013. Na segunda avaliação de resposta (após 10 doses) em 23 de maio de 2013, a lesão alvo encolheu em 39%, constituindo

assim uma resposta parcial por critérios de RECIST. Ela tem continuado o tratamento até à data de 14/06/13, recebendo 6 ciclos que constituem 12 doses do hRS7-SN-38 (IMMU-132) em 8 mg/kg. Sua saúde de maneira geral e seus sintomas clínicos melhoraram consideravelmente desde o início desse tratamento investigativo.

Exemplo 15. Uso do hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar o câncer de mama metastático refrativo a terapia

[00353] O paciente era uma mulher de 57 anos com câncer de mama de estágio IV, triplo negativo (ER/PR negativo, HER-neu negativo), diagnosticado originalmente em 2005. Ela foi submetida a uma lumpectomia de seu peito esquerdo em 2005, seguida de um ACT denso de dose em configuração adjuvante em setembro de 2005. Ela recebeu então uma terapia de radiação, que foi terminada em novembro. A recorrência local da doença foi identificada quando a paciente apalpou um caroço no peito contralateral (direito) no início de 2012, e então foi tratada com quimioterapia CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil). Sua doença retornou no mesmo ano, com lesões metastáticas na pele da parede torácica. Ela recebeu então um regime quimioterápico de carboplatina + TAXOL®, durante o qual surgiu a trombocitopenia. A doença dela progrediu e ela começou a receber doxorrubicina semanalmente, o que foi repetido por 6 doses. A doença de pele também estava progredindo. Uma varredura de FDG-PET em 26/09/12 mostrou uma progressão da doença na parede torácica e nódulos axilares aumentados, sólidos. A paciente recebeu oxicodona para controlar a dor.

[00354] Ela recebeu IXEMPRA® de outubro de 2012 até fevereiro de 2013 (de 2 em 2 semanas durante 4 meses), quando a lesão da parede torácica se abriu e sangrou. Ela então recebeu aplicações de XELODA®, que não era bem tolerado devido à neuropatia nas mãos e nos pés dela, assim como pela

constipação. As lesões de pele foram progressivas e então ela foi inscrita na experimentação com IMMU-132 após dar um consentimento informado. O paciente teve também um histórico médico de hipertiroidismo e distúrbios visuais, com alto risco de doenças CNS (no entanto, a MRI do cérebro deu negativo para doença CNS). No período do registro nessa experimentação, as lesões cutâneas dela (alvo) no peito direito mediam 4.4 cm e 2.0 cm no diâmetro maior. Ela teve outra lesão não-direcionada no peito direito e um nódulo linfático aumentado, um na axila direita e outro na esquerda.

[00355] A primeira infusão de IMMU-132 (12 mg/kg) foi iniciada em 12 de março de 2013, e foi bem tolerada. Sua segunda infusão foi atrasada devido à redução (0.9) da contagem absoluta dos neutrófilos de nível 3 (ANC) no dia marcado para a infusão, uma semana depois. Depois do atraso de uma semana e após ter recebido NEULASTA®, seu segundo IMMU-132 foi administrado, com uma redução de dose de 25% em 9 mg/kg. Depois disso, ela tem recebido o IMMU-132 em cronograma como por protocolo, uma vez por semana durante 2 semanas, seguidas de uma semana sem receber a dose. Sua primeira avaliação de resposta em 17 de maio de 2013, após 3 ciclos de terapia, mostrou uma diminuição de 43% na soma do diâmetro longo das lesões alvo, constituindo uma resposta parcial por critérios de RECIST. Ela está continuando o tratamento no nível de dose de 9 mg/kg. Sua saúde em geral e seus sintomas clínicos melhoraram consideravelmente desde que começou o tratamento com IMMU-132.

Exemplo 16. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar câncer pulmonar, refratário, metastático, de célula não-pequena

[00356] Trata-se de um homem de 60 anos, diagnosticado com câncer pulmonar de célula não-pequena. O paciente recebeu regimes de quimioterapia de carboplatina, bevacizumabe por 6 meses e apresentou

resposta, e em seguida, depois de progredir, recebeu outros cursos de quimioterapia com carboplatina, etoposide, TAXOTERE®, gencitabina durante os 2 anos seguintes, com respostas ocasionais que duraram não mais do que 2 meses. O paciente apresenta-se então com uma massa mediastinal esquerda medindo 6.5 x 4 cm e efusão pleural.

[00357] Após ter assinado um consentimento informado, o paciente recebeu IMMU-132 a uma dose de 18 mg/kg em semanas intercaladas. Durante as primeiras duas injeções, breves períodos de neutropenia e diarreia foram experimentados, com 4 movimentos intestinais em 4 horas, mas estes são resolvidos ou respondem a medicações sintomáticas em 2 dias. Após um total de 6 infusões de IMMU-132, a avaliação do CT da lesão indicativa mostra uma redução de 22%, logo abaixo de uma reação parcial, mas definitiva, do encolhimento do tumor. O paciente continua com essa terapia por outros dois meses, quando uma reação parcial de encolhimento de tumor de 45% da soma dos diâmetros da lesão indicadora foi notada por CT, constituindo assim uma reação parcial por critérios de RECIST.

Exemplo 17. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar câncer refratário, metastático, de célula não-pequena

[00358] Trata-se de uma mulher de 65 anos com diagnóstico de câncer pulmonar de célula pequena, envolvendo o seu pulmão esquerdo, os nódulos linfáticos mediastinais e evidência por MRI de metástase no lóbulo cerebral parietal esquerdo. A quimioterapia prévia incluía carboplatina, etoposida e topotecano, mas não notou-se reação alguma. A terapia por radiação também não obteve êxito no controle da doença dela. Ela então recebeu IMMU-132 em um dose de 18 mg/kg, uma vez a cada três semanas, para um total de 5 infusões. Após a segunda dose, ela passou por hipotensão e uma neutropenia de nível 2, que melhora antes da infusão seguinte. Após a

quinta infusão, um estudo por CT mostra encolhimento de 13% da massa pulmonar esquerda alvo dela. A MRI do cérebro mostra também uma redução de 10% dessa metástase. Ela continua sua dosagem de IMMU-132 de 3 em 3 semanas por mais 3 meses e continua mostrando melhorias objetivas e subjetivas em sua condição, com uma redução de 25% da massa pulmonar esquerda e uma redução de 21% da metástase cerebral.

Exemplo 18. Terapia de um paciente de câncer gástrico com doença metastática em fase IV com hRS7-SN-38 (IMMU-132)

[00359] Esse paciente é um homem de 60 anos com histórico de fumante e períodos de ingestão excessiva de álcool por um período de 40 anos. Ele experimentou uma perda de peso, desconforto na hora de comer e dor não aliviada por antiácidos, dor abdominal frequente, dor na região lombar e, mais recentemente, nódulos palpáveis em ambas as axilas. Ele procurou ajuda médica e, em seguida um exame mostrou que havia um adenocarcinoma, incluindo algumas características escamosas, na junção gastroesofagal, baseada em biópsia através de uma gastroscopia. Estudos radiológicos (CT e FDG-PET) também revelaram doença metastática na axila direita e na esquerda, na região mediastinal, na espinha lombar e no fígado (2 tumores no lóbulo direito e 1 na esquerda, todos medindo entre 2 e 4 cm de diâmetro). Seu tumor gástrico foi ressecado e ele então foi colocado em cursos de quimioterapia com epirubicina, cisplatina e 5-fluorouracil. Após 4 meses e um período de descanso de 6 semanas, ele foi passado para quimioterapia docetaxel, que também não obteve êxito no controle da doença, baseada em progressão confirmada por medições por CT dos tumores metastáticos e em algumas deteriorações gerais.

[00360] O paciente recebeu então uma terapia com IMMU-132 (hRS7-SN-38) em uma dose de 10 mg/kg infundida em semanas intercaladas

em um total de 6 doses, depois disso os estudos por CT foram realizados para avaliar a condição da doença dele. Essas infusões foram bem toleradas, com náusea e diarreia suaves, controladas com medicações sintomáticas. Os estudos por CT revelaram que a soma de suas lesões metastáticas indicativas diminuíram em 28%, de modo que ele continuou essa terapia por mais 5 cursos. Estudos por CT de acompanhamento mostram que a doença permanece aproximadamente 35% reduzida por critérios de RECIST de suas medições de linha de base antes da terapia com IMMU-132, e sua condição geral parece também ter melhorado, com o paciente readquirindo uma atitude otimista em relação ao fato de sua doença estar sob controle.

Exemplo 19. Terapia refratária de paciente com câncer de cólon avançada para quimioimunoterapia prévia, usando apenas IMMU-130 (labetuzumabe-SN-38)

[00361] O paciente é um homem de 50 anos com um histórico de câncer colônico metastático de fase IV, diagnosticado inicialmente em 2008 e recebeu uma colectomia e uma hepatectomia parcial para os cânceres colônicos metastáticos e primários, respectivamente. Ele recebeu então quimioterapia, conforme indicado na **FIG. 8**, que incluía irinotecano, oxaliplatina, FOLFIRINOX (5-fluoruracil, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina) e bevacizumabe, assim como bevacizumabe combinado com 5 fluorouracil/leucovorina, por quase 2 anos. Depois disso, ele recebeu cursos de cetuximabe, sozinho ou combinado com quimioterapia de FOLFIRI (leucovorina, flurouracil 5, irinotecano) durante o ano seguinte ou mais. Em 2009, ele recebeu uma terapia de ablação de radiofrequência para a metástase do fígado enquanto estava sob quimioimunoterapia, e ao fim de 2010 ele foi submetido a uma ressecção em cunha de sua metástase pulmonar, que foi repetida alguns meses mais tarde, no início de 2011. Apesar de passar por

quimioimunoterapia em 2011, uma nova metástase pulmonar surgiu ao fim de 2011, e em 2012 metástases pulmonar e do fígado foram visualizadas. Seu título de antígeno carcinoembriônico (CEA) de plasma de linha de base foi de 12.5 ng/mL pouco antes de ele ser submetido à terapia anticorpo-droga com IMMU-130. As lesões indicativas escolhidas pelo radiologista para medir a mudança no tamanho do tumor por tomografia computadorizada foram o lóbulo médio do pulmão direito e a metástase do fígado, ambas tendo um total de 91 mm como soma de seus diâmetros mais longos na linha de base antes da terapia com IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38).

[00362] O paciente recebeu doses de 16 mg/kg de IMMU-130 por infusão lenta IV em semanas intercaladas para um total de 17 doses de tratamento. O paciente tolerou bem a terapia, tendo somente uma náusea, diarreia e fadiga de nível 1 após o primeiro tratamento, que ocorreu após os tratamentos 4 e 5, mas não a partir disso, pois ele recebeu medicação para esses efeitos colaterais. Após o tratamento 3, ele apresentou alopecia (nível 2), que estava presente durante a terapia subsequente. A náusea, a diarreia e os vômitos ocasionais duraram apenas de 2 a 3 dias, e a sua fadiga depois da primeira infusão durou 2 semanas. Fora isso, o paciente tolerou bem a terapia. Por ter recebido esse anticorpo humanizado (enxertado com CDR) conjugado com SN-38 por uma longa duração, seu sangue foi avaliado para verificar se havia anticorpo anti-labetuzumabe e nada foi detectado, mesmo após 16 doses.

[00363] As primeiras medições por tomografia computadorizada (CT) foram feitas após 4 tratamentos e mostraram uma mudança de 28.6% na soma das medidas feitas na linha de base, antes dessa terapia, nas lesões indicativas. Após 8 tratamentos, essa redução foi para 40.6%, constituindo assim uma remissão parcial de acordo com critérios de RECIST. Essa resposta foi mantida

por mais 2 meses, quando suas medições por CT indicaram que as lesões indicativas foram 31.9% inferiores às medições de linha de base, mas um tanto maiores do que a diminuição de 40.6% medida anteriormente. Assim, com base em medições por CT cuidadosas das lesões indicativas no pulmão e no fígado, esse paciente, que não obteve êxito em quimioterapias e imunoterapias anteriores, incluindo o irinotecano (molécula de origem do SN-38), apresentou uma resposta objetiva ao metabólito ativo de irinotecano (ou camptotecina), SN-38, quando direcionado através do anticorpo humanizado anti-CEACAM5, labetuzumabe (hMN-14). Foi surpreendente que embora o irinotecano (CPT-11) aja pela liberação do SN-38 *in vivo*, o anticorpo conjugado anti-CEACAM5 de SN-38 tenha se mostrado efetivo em um paciente com câncer colorretal induzindo uma resposta parcial após o paciente não tendo obtido êxito em sua última terapia contendo irinotecano. A redução do título de CEA do plasma do paciente também corroboraram as descobertas por CT: ele caiu do nível de linha de base de 12.6 ng/mL para 2.1 ng/mL após a terceira dose da terapia e ficou entre 1.7 e 3.6 ng/mL entre 8 e 12 doses. Considera-se o título de plasma normal de CEA como estando entre 2.5 e 5.0 ng/mL, de modo que essa terapia efetuou uma normalização do título de CEA dele no sangue.

Exemplo 20. Terapia de um paciente com câncer colônico avançado com IMMU-130

[00364] Esse paciente é uma mulher de 75 anos inicialmente diagnosticada com câncer colônico metastático (fase IV). Ela teve uma hemicolectomia parcial direita e uma ressecção de seu intestino pequeno e então recebeu FOLFOX, FOLFOX + bevacizumabe, FOLFIRI + ramucirumabe e terapias de FOLFIRI + de cetuximabe por um ano e meio, quando ela apresentou progressão da doença, com difusão da doença para o seu fundo de saco traseiro, uma metade, quando mostra a progressão da doença, com

propagação da doença ao beco sem saída posterior, omento, com ascite em sua pélvis e efusão pleural no lado direito de sua cavidade torácica. Seu título de CEA de linha de base antes dessa terapia era de 15 ng/mL. Ela recebeu 6 mg/kg de IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38) duas vezes por semana por 2 semanas consecutivas, e então teve uma semana de descanso (ciclo de 3 semanas), para então receber mais 20 doses, o que foi muito bem tolerado, sem grandes toxicidades hematológicas ou não-hematológicas. Dentro de 2 meses da terapia, seu título de CEA de plasma encolheu razoavelmente para 1.3 ng/mL, mas na avaliação de 8 semanas ela apresentou um encolhimento de 21% das lesões indicativas do tumor, que aumento para um encolhimento de 27% em 13 semanas. Surpreendentemente, a ascite da paciente e a efusão pleural diminuíram (com o posterior desaparecimento) nesse período, melhorando consideravelmente, assim, a condição da paciente. A paciente continua sua terapia investigativa.

Exemplo 21. Paciente com câncer gástrico com doença metastática de fase IV tratado com IMMU-130

[00365] O paciente é um homem de 52 anos que procurou ajuda médica por conta de um desconforto gástrico e uma dor relacionada à alimentação por 6 anos e com perda de peso durante os últimos 12 meses. Ao apalpar-se a região do estômago percebe-se um caroço sólido, que passou então por gastroscopia, revelando uma massa ulcerosa na parte inferior do seu estômago. Ela foi biopsiada e diagnosticada como um adenocarcinoma gástrico. Os testes laboratoriais não revelaram nenhuma alteração anormal específica, exceto que os testes de funcionamento do fígado, de LDH e de CEA estavam elevados, o último sendo de 10.2 ng/mL. A patente submete-se então a uma varredura PET de corpo total, o que mostra, além do tumor gástrico, doença metastática na axila esquerda e no lóbulo direito do fígado (2

metástases pequenas). O paciente teve seu tumor gástrico ressecado e teve então medições por CT de linha de base de seus tumores metastáticos. Quatro semanas após a cirurgia, ele recebeu 3 cursos de quimioterapia de combinação, consistindo em um regime de cisplatina e 5-fluorouracil (CF), mas não o tolerou bem, então foi mudado para um tratamento com docetaxel. Aparentemente a doença permaneceu estável durante aproximadamente 4 meses, com base em varreduras por CT, mas em seguida as reclamações do paciente sobre mais perda de peso, dores abdominais, perda de apetite e extrema fadiga levaram a repetidos estudos por CT, que mostraram aumento no tamanho da metástase em uma soma de 20% e uma lesão suspeita no lugar da ressecção gástrica original.

[00366] O paciente recebeu uma terapia experimental com IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38) em um cronograma semanal de 8 mg/kg. Ele tolerou bem essa dose, mas após 3 semanas apresentou uma neutropenia de nível 2 e diarreia de nível 1. Sua quarta infusão foi adiada em uma semana, e então as infusões semanais foram reinstituídas, sem evidência de diarreia ou neutropenia pelas 4 injeções seguintes. O paciente foi então submetido a um estudo por CT para medir os tamanhos do seu tumor metastático e para visualizar a área original da ressecção gástrica. O radiologista verificou, de acordo com critérios de RECIST, uma diminuição na soma das lesões metastáticas, em comparação à linha de base anterior à terapia com IMMU-130, de 23%. Não pareceu haver nenhuma lesão evidente na área da ressecção gástrica original. O título de CEA do paciente neste período é de 7.2 ng/mL, o que é bastante reduzido em relação ao valor pré-IMMU-130 de linha de base de 14.5 ng/mL. O paciente continua na terapia semanal com IMMU-130 na mesma dose de 8.0 mg/kg, e após um total de 13 infusões, seus estudos por CT mostram que uma metástase do fígado desapareceu e a soma de todas as

lesões metastáticas diminuíram em 41%, constituindo uma resposta parcial por RECIST. A condição geral do paciente melhorou e ele segue com suas atividades habituais enquanto continua a receber uma terapia de manutenção de 8 mg/kg de IMMU-130 de 3 em 3 semanas com outras 4 injeções. Na última medição de CEA do sangue CEA, o valor é 4.8 ng/mL, o que está dentro do nível normal para um fumante, que é o caso do paciente.

Exemplo 22. Terapia de câncer de mama metastático triplo-negativo reincidente com hMN-15-SN-38

[00367] Uma mulher de 58 anos com câncer de mama metastático triplo-negativo tratado anteriormente com bevacizumabe mais paclitaxel, sem resposta, apresenta-se com metástase em diversas costelas, vértebra lombar, uma lesão isolada medindo 3 cm de diâmetro em seu pulmão esquerdo, com dor óssea considerável e fadiga. Ela recebeu uma terapia experimental com anticorpo monoclonal anti-CEACAM6 humanizado, IgG hMN-15, conjugado com 6 moléculas de SN-38 por IgG. Ela recebe uma infusão de 12 mg/kg de três em três semanas, reperida por 4 doses, como um curso de terapia. À exceção da neutropenia transitória de nível 2 e de um pouco de diarreia no início, ela tolerou bem a terapia, que é então repetida, após um descanso de 2 meses, por um novo curso. A exame radiológico indicou que ela apresentou resposta parcial por critérios RECIST, por conta da soma da diminuição dos diâmetros das lesões indicativas em 39%. Sua condição geral, incluindo a dor óssea, também melhorou, e ela retoma praticamente o mesmo nível de atividades praticadas antes da doença.

Exemplo 23. Terapia do carcinoma colônico metastático reincidente, geralmente refratário, com hMN-15-SN-38

[00368] Uma mulher de 46 anos com câncer colônico metastático de fase IV, com um histórico anterior de ressecção da lesão primária, que também

teve metástases sincronizadas do fígado em ambos os lóbulos do fígado, assim como um foco único de difusão para o pulmão direito; essas metástases foram medidas por CT e apresentaram entre 2 e 5 cm de diâmetro. Ela foi submetida a vários cursos de quimioterapia durante um período de 3 anos, incluindo 5-fluorouracil, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina, cetuximabe e bevacizumabe. Em duas ocasiões, houve evidência de estabilização da doença ou de uma resposta a curto prazo, mas nenhuma redução de 30% ou mais das lesões medidas. Seu título de CEA do plasma em linha de base antes da terapia com hMN-14-SN-38 é de 46 ng/mL, e sua totalidade de lesões indicativas mediram uma soma de 92 mm.

[00369] A terapia com hMN-15-SN-38 foi instituída em 12 mg/kg semanais por 2 semanas, com um período de descanso de uma semana depois disso, dentro de um ciclo de 21 dias. Esse ciclo é repetido 3 vezes, apenas com efeitos colaterais de neutropenia transiente e gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia). Surpreendentemente, apesar de não obter êxito na resposta à terapia com FOLFIRI (que inclui irinotecano, ou CPT-11), a paciente apresentou uma resposta parcial por critérios RECIST após a conclusão da terapia. Ela então foi colocada em um cronograma de manutenção dessa terapia em uma dose de 16 mg/kg uma vez por mês pelos 6 meses seguintes. As varreduras de acompanhamento mostraram que a doença permanece sob controle como uma resposta parcial (PR), e a paciente apresenta boas condições, em geral, com um desempenho de performance de Kaaarnofsky de 90%.

Exemplo 24. Paciente com câncer colônico com doença metastática de fase IV tratado com o conjugado anti-CSAp-SN-38

[00370] Este paciente apresenta metástase de câncer colônico no lóbulo esquerdo do fígado e em ambos os pulmões, após ter uma ressecção de

um adenocarcinoma do cólon sigmoide de 9 cm, seguida por uma quimioimunoterapia com FOLFOLIFIRI e cetuximabe por 6 meses, e então FOLFOX seguido por bevacizumabe por um período adicional de 9 meses. Dez meses após a ressecção inicial e em seguida o início da terapia, a doença que pensou-se que fosse estável apresentou progressão através de lesões crescentes e uma nova metástase surgindo na glândula adrenal esquerda. Seu CEA do plasma neste período foi de 52 ng/mL, e sua condição geral parece ter deteriorado, com dores abdominais, fadiga e anemia limítrofe, sugerindo um possível sangramento interno.

[00371] Ela então recebeu um conjugado de SN-38 do anticorpo hMu-9 (anti-CSAp) a uma dose semanal de 12 mg/kg por duas semanas, com uma semana de descanso, como um ciclo de tratamento, e então repetiu ciclos de tratamento adicionais, passando por medições através de coleta de sangue semanal e recebendo medicação de atropina para reações gastrointestinais. Uma alopecia de nível 2 é notada após o primeiro ciclo de tratamento, mas apenas uma neutropenia de nível 1. Após 3 ciclos de tratamento, seu título de CEA do plasma foi reduzido para 19 ng/ml, e nesse período suas medições por CT mostraram uma diminuição das lesões indicativas no fígado e nos pulmões em 24.1%. Após um adicional de 3 cursos de terapia, ela apresentou uma redução por CT das lesões indicativas de 31.4% e uma diminuição no tamanho da massa adrenal em aproximadamente 40%. Considera-se que essa paciente respondeu à terapia anticorpo-droga com anti-CSAp-SN-38 paciente e ela continuou com essa terapia. Sua condição geral parece ter melhorado, com menos fadiga, nenhuma dor ou desconforto abdominal e em geral apresenta mais energia.

Exemplo 25. Tratamento do Câncer de Mama com o Imunoconjuguado anti-CEACAM6-SN-38

[00372] Esta paciente tem câncer de mama metastático triplo-negativo (não expressa receptor de estrógeno, receptor de progesterona ou Her2/neu) que foi reincidente após diversas terapias diferentes ao longo dos 3 últimos anos. Ela apresenta-se com diversos tumores pequenos em ambos os pulmões, assim como metástases em suas vértebras C4, C5, T2 e T3 e em várias costelas bilateralmente. Ela ficou sob uma terapia padrão para as suas lesões osteolíticas e agora começou um tratamento com hMN-15-SN-38 em uma dose de 16 mg/kg, uma vez por semana, por 3 semanas, com uma pausa de uma semana, e então prosseguiu com essa terapia de ciclo de 3 semanas por mais duas vezes. 2 semanas após a terapia, executam-se varreduras por CT para verificar a resposta e nota-se que 2 das pequenas metástases pulmonares desapareceram, enquanto que uma das lesões maiores parece ter diminuído em aproximadamente 40%. As metástases nas vértebras ainda estão presentes, mas as lesões de C4 e C5 parecem estar reduzidas em aproximadamente 25%. Das metástases das costelas, 2 das 6 pequenas lesões parecem estar bem menores e não se tem certeza se são viáveis ou se são pequenas regiões de cicatriz ou necrose. Os marcadores do tumor da paciente, assim como o título de LDH dela, parecem mostrar níveis estáveis ou reduzidos, indicando que a progressão da doença foi interrompida e também há algumas evidências de redução da doença. Subjetivamente, a paciente agora se sente muito melhor, com menos fatiga e dores ósseas e consegue respirar melhor. Ela teve uma leve náusea e vômito após cada uma das terapias, que foram superados em uma semana. O único outro efeito colateral foi uma trombocitopenia transiente, que também foi superada em 7 dias. Ela tem sido observada e vai concluir os ciclos de terapia em 2 meses.

Exemplo 26. Tratamento de Câncer do Côlon Metastático com Imunoconjungados de Combinação Anti-CEACAM5 e Anti-CEACAM6-SN-38

[00373] Esta paciente tem câncer colônico metastático, com evidência por CT de doença no fígado (lesão de 5 cm no lóbulo direito e lesão de 3 cm no lóbulo esquerdo), assim como 2 metástases (com tamanhos de 2 e 3 cm) no pulmão direito. O câncer primário do cólon foi anteriormente ressecado e o paciente passou por cursos de terapia pós-operatória por conta de metástases metacrônicas no fígado e nos pulmões. Durante a terapia, as metástases do fígado cresceram e a metástase do pulmão dobrou, de modo que o paciente é um candidato para quimioimunoterapia experimental. Ele então foi iniciado em um curso de conjugados duplos anticorpo-droga, labetuzumabe (hMN-14)-SN-38 e hMN-15-SN-38, cada um deles em dias alternados e doses de 8 mg/kg, uma vez por semana durante 2 semanas, repetidos mensalmente durante 4 meses. Duas semanas após a terapia, a condição do paciente foi verificada por CT e testes laboratoriais. As varreduras por CT revelaram que o tumor grande no lóbulo direito do fígado foi reduzido em 50%, o tumor no lóbulo esquerdo em aproximadamente 33% e as metástases do pulmão em aproximadamente 20% cumulativamente em ambos os tumores. Seu título de CEA sanguíneo foi diminuído de 22 ng/mL no início da terapia para 6 ng/mL a partir do período de acompanhamento. Subjetivamente, o paciente afirmou que está se sentindo mais forte e também parece apresentar mais vigor em suas atividades cotidianas. Os efeitos colaterais são leucopenia e trombocitopenia transiente, voltando a níveis normais em 2 semanas após a terapia, e diversos períodos de náusea e vômito, controlados por medicação antiemética. Planeja-se que o paciente reiniciará esses ciclos de terapia em cerca de 2 meses, seguidos de uma nova verificação das condições da doença.

Exemplo 27. Infusão Contínua do Conjugado Anticorpo-Droga

[00374] O paciente foi previamente ressecado por conta de um

carcinoma retal e recebeu radioquimioterapia pré e pós-operatória como tratamento convencional. Ela ficou livre do tumor por quatro anos, mas agora apresenta 3 pequenas lesões metastáticas no lóbulo do fígado direito, descobertas por rotina por CT e valores de CEA sanguíneo por acompanhamento, que aumentaram para 6.3 ng/mL a partir dos 3.0 ng/mL após a terapia inicial. Ela recebeu um cateter permanente e uma infusão contínua de labetuzumabe-SN-28 em uma dose de 2 mg/kg durante 17 dias. Ela então recebeu uma terapia de infusão contínua repetida 5 semanas depois, agora durante 3 semanas, a 1 mg/kg. Três semanas mais tarde, varreduras por CT e monitoramento de CEA sanguíneo revelaram que 1 das metástases do fígado haviam desaparecido e que as outras duas estavam do mesmo tamanho ou ligeiramente menores. O título de CEA sanguíneo agora mede 2.4 ng/mL. Ela não esteve sintomática e apresentou apenas vômito e náusea de nível 2, enquanto passou pela terapia, e neutropenia de nível 2, ambos resolvidos com o tempo.

Exemplo 28. Terapia de Câncer de Cólon Metastático Avançado com o Imunoconjugado Anti-CEACAM5

[00375] O paciente é um homem de 50 anos que não obteve êxito nas terapias anteriores para câncer de cólon metastático. A primeira linha da terapia é FOLFIRINOX + AVASTIN® (constituída de uma maneira gradual) começando com IROX (Irinotecano+ Oxaliplatina) no primeiro ciclo. Após ter iniciado este tratamento, o paciente passou por um CT que mostrou uma diminuição nas metástases do fígado. A isso seguiu-se uma cirurgia para remover o tecido do tumor. A quimioterapia adjuvante é uma continuação do regime da primeira linha (sem a parte do IROX) que resultou em um período livre de recorrência transitória. Após aproximadamente um intervalo de 1 ano, uma CT revelou o retorno das metástases do fígado. Isso levou à iniciação do

regime da segunda linha (FOLFIRI + Cetuximabe). Outra CT mostrou uma resposta nas metástases do fígado. A ablação por RF das metástases do fígado foi executada, seguida pela continuação da quimioterapia adjuvante com FOLFIRINOX + Cetuximabe, seguida pela manutenção de Cetuximabe por aproximadamente um ano. Outra varredura por CT não mostrou nenhuma evidência da doença. Uma varredura adicional mostrou possíveis nódulos pulmonares, que foram confirmados. Isso leva a uma ressecção por cunha dos nódulos pulmonares. Subsequentemente, FOLFIRI +Cetuximabe foi reiniciado e continuado. Uma varredura por CT posterior mostrou metástases no pulmão e no fígado.

[00376] No período de administração do imunoconjugado hMN-14-SN-38, o câncer do cólon metastático do paciente avançou, com metástases do pulmão e do fígado, que não responderam ao irinotecano (camptotecina). O imunoconjugado hMN-14-SN-38 é administrado em um dosagem de 12 mg/kg, que é repetida em semanas intercaladas. O paciente apresentou uma resposta parcial com redução dos tumores metastáticos por critérios de RECIST.

[00377] É de se notar que apenas um paciente nesse coorte de 12 mg/kg (dado em semanas intercaladas) apresentaram (neutropenia) hematológica de nível 2 e a maioria dos pacientes teve náusea, vômito ou alopecia de nível 1 e 2 – que são sinais de atividade do conjugado anticorpo-droga, mas bem tolerados. O efeito da meação do anticorpo para um direcionamento melhorado da camptotecina conta para a eficácia da meação do SN-38 no câncer que foi anteriormente resistente ao irinotecano não-conjugado.

Exemplo 29. Tratamento do Câncer Pancreático Metastático com o Imunoconjugado Anti-MUC5ac-SN-38

[00378] Esta paciente de 44 anos tem um histórico de carcinoma

pancreático metastático, com um adenocarcinoma ductal pancreático inoperável na cabeça do pâncreas e apresentando metástases nos lóbulos esquerdo e direito do fígado, aquele medindo 3 x 4 cm e este medindo 2 x 3 cm. O paciente recebeu um curso de gencitabina, mas não apresentou nenhuma resposta objetiva. Quatro semanas mais tarde, ele recebeu hPAM4-SN-38 i.v. em uma dose de 8 mg/kg, duas vezes semanais, por 2 semanas, e então o tratamento foi repetido por 2 ciclos. Os estudos por CT foram feitos uma semana depois e mostraram uma redução total na massa do tumor (todos os locais) de 32% (resposta parcial), juntamente com uma queda em seu título de CA19-9 sanguíneo de 220 em linha de base para 75 na ocasião da avaliação radiológica. O paciente apresentou apenas vômito e náusea de nível 1 após cada tratamento com o conjugado anticorpo-droga e neutropenia de nível 2 ao fim do último ciclo do tratamento, que foi superada 4 semanas depois. Nenhuma pré-medicação foi dada para evitar reações à infusão.

Exemplo 30. Uso do hL243-SN-38 para tratar o câncer colônico metastático refrativo a terapia (mCRC)

[00379] O paciente é um homem de 67 anos que apresenta câncer do cólon metastático. Seguido à colectomia transversal logo após o diagnóstico, o paciente recebeu 4 ciclos de quimioterapia de FOLFOX em uma configuração neoadjuvante antes da hepatectomia parcial para remoção das lesões metastáticas no lóbulo esquerdo do fígado. A isso seguiu-se um regime adjuvante FOLFOX para um total de 10 ciclos de FOLFOX.

[00380] A CT mostra metástases no fígado. Sua lesão alvo é um tumor de 3.0 cm no lóbulo esquerdo do fígado. As lesões não-direcionadas incluíam diversas massas hipoatenuadas no fígado. A linha de base de CEA é de 685 ng/mL.

[00381] Depois que o paciente assinou o consentimento informado,

deu-se o hL243-**SN-38** (10 mg/kg) em semanas intercaladas durante 4 meses. O paciente apresentou náusea (nível 2) e fatiga (nível 2) após o primeiro tratamento e continuou o tratamento sem grandes eventos adversos. A primeira avaliação de resposta feita (depois de 8 doses) mostra um encolhimento da lesão alvo em 26% por tomografia computadorizada (CT) e seu nível de CT diminui para 245 ng/mL. Na segunda avaliação de resposta (depois de 12 doses), a lesão alvo encolheu em 35%. Sua saúde no geral e seus sintomas clínicos melhoraram consideravelmente.

Exemplo 31. Tratamento de linfoma folicular reincidente com IMMU-114-SN-38 (anti-HLA-DR-SN-38)

[00382] Após ter recebido a quimioterapia de R-CHOP para o linfoma folicular apresentando doença extensiva em vários nódulos linfáticos regionais (cervical, axilar, mediastinal, inguinal, abdominal) e comprometimento na medula, esse homem de 68 anos recebeu um agente experimental, IMMU-114-SN-38 (anti-HLA-DR-SN-38), em uma dose de 10 mg/kg semanais, por 3 semanas, com um descanso de 3 semanas, e então um segundo curso por mais 3 semanas. Ele então é avaliado para ver se houve mudanças nas lesões indicativas do tumor por CT, que mostrou uma redução de 23% conforme critérios de CHESON. A terapia é repetida para outros 2 cursos, que mostram então uma redução a 55% do tumor por CT, o que se trata de uma resposta parcial.

Exemplo 32. Tratamento de leucemia linfocítica crônica reincidente com IMM-114-SN-38

[00383] Um homem de 67 anos com histórico de CLL, conforme definição do International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (Workshop Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crônica) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), apresenta uma reincidência da doença antes das

terapias com fludarabina, dexametasona e rituximabe, assim como um regime de CVP. Ele agora tem febre e suor durante a noite, associados com o aumento generalizado do nódulo linfático, uma redução na hemoglobina e produção de plaquetas, assim como um crescimento rápido na contagem de leucócitos. Seu LDH está elevado e a beta-2-microglobulina está quase o dobro do normal. O paciente recebeu uma terapia com o conjugado IMMU-114-SN-38 em um esquema de dosagem de 8 mg/kg semanais por 4 semanas, um descanso de 2 semanas, e então o ciclo foi repetido outra vez. A avaliação mostrou que os parâmetros hematológicos do paciente estão melhorando e que as suas células CLL circulantes parecem estar diminuindo em quantidade. A terapia é então recomeçada por mais 3 ciclos, depois dos quais seus valores hematológicos e laboratoriais indicam que ele apresentou uma resposta parcial.

Exemplo 33. Uso do hMN-15-SN-38 para tratar câncer pulmonar, refratário, metastático de célula não-pequena

[00384] Trata-se de um homem de 58 anos diagnosticado com câncer pulmonar de célula não-pequena. Ele recebeu inicialmente regimes de quimioterapia de carboplatina, bevacizumabe por 6 meses e apresentou uma resposta, e em seguida, depois de progredir, recebeu outros cursos de quimioterapia com carboplatina, etoposide, taxotere®, gencitabina durante os 2 anos seguintes, com respostas ocasionais que duraram não mais do que 2 meses. O paciente então apresenta uma massa mediastinal esquerda medindo 5.5 x 3.5 cm e efusão pleural.

[00385] Após ter assinado um consentimento informado, o paciente recebeu hMN-15-SN-38 em uma dose de 12 mg/kg em semanas intercaladas. Durante as primeiras duas injeções, breves períodos de neutropenia e diarreia foram experimentados, mas estes foram resolvidos ou manifestaram resposta a medicações sintomáticas em 2 dias. Após um total de 6 infusões de hMN-15-

SN-38, a avaliação por CT da lesão alvo mostra uma redução de 22%. O paciente continua com essa terapia por mais dois meses, quando nota-se uma resposta parcial de 45% por CT.

Exemplo 34. Tratamento de paciente com linfoma folicular com hA19-SN-38.

[00386] Um homem de 60 anos apresentou dor abdominal e a presença de uma massa palpável. O paciente passou por estudos por CT e FDG-PET que confirmaram a presença da massa com adenopatias patológicas nos nódulos mediastino, axilar e do pescoço. Os testes laboratoriais não apresentaram nada de excepcional, exceto LDH e beta-2-microglobulina elevadas. A biópsia da medula óssea revelou diversos agregados linfoïdes paratrabeculares e perivasculares. Trata-se de linfocíticos com expressão de imunocolorações de CD20, CD19 e CD10. O diagnóstico final é de um linfoma folicular de nível 2, fase IVA, com uma pontuação FLIPI de 4. O diâmetro mais longo do nódulo mais amplo envolvido é de 7 cm. O paciente recebeu um IgG de anticorpo humanizado monoclonal anti-CD19 (hA19) conjugado com SN-38 (6 moléculas de droga por IgG). A dosagem é de 6 mg/kg semanais por 4 semanas consecutivas, com descanso de duas semanas, e em seguida ciclos repetidos de 4 semanas de tratamento de 6 em 6 semanas. Após 5 ciclos, a medula óssea e as avaliações por imagem (CT) apresentaram uma resposta parcial, em que as lesões mensuráveis diminuíram em aproximadamente 60% e a medula óssea estava muito menos infiltrada. Ademais, os títulos de beta-2microglobulina e LDH também diminuíram.

Exemplo 35. Tratamento de ALL de célula-B precursora reincidente com hA19-SN-38

[00387] Essa mulher de 51 anos foi submetida a uma terapia para ALL de célula-B precursora, cromossomo-negativa Filadélfia, que mostrou que

colorações celulares de ALL para CD19, CD20, CD10, CD38, CD45. Mais de 20% da medula e dos linfoblastos sanguíneos expressaram CD19 e CD20. O paciente recebeu terapia prévia com clofarabina e citarabina, resultando em uma considerável toxicidade hematológica, mas sem resposta nenhuma. Um curso de dose elevada de citarabina (ara-C) também foi iniciado, mas a paciente não conseguiu tolerá-lo. Ela recebeu terapia com hA19-SN-38 em doses semanais por infusão de 6 mg/kg por 5 semanas, e então teve um descanso de 2 semanas, com a repetição dessa terapia por mais duas vezes. Surpreendentemente, ela apresentou melhora em suas contagens sanguíneas e de medula, suficiente para que uma resposta parcial pudesse ser determinada. Após um descanso de 2 meses devido à neutropenia (nível 3), a terapia prosseguiu em 8 mg/kg em semanas intercaladas por mais 4 cursos. Nesse período, ela apresentou grande melhora e está sob consideração quanto à manutenção da terapia para tentar trazê-la a uma condição em que ela possa se tornar candidata para um transplante de célula-tronco.

Exemplo 36. Tratamento de Linfoma com o Imunoconjugado Anti-CD22-SN-38

[00388] O paciente é um homem de 62 anos com linfoma de célula-B grande difusa reincidente (DLBCL). Após 6 cursos de quimioimunoterapia de R-CHOP, ele apresenta agora uma difusão extensiva do nódulo linfático nos nódulos linfáticos do mediastino, axilares e inguinais. Ele recebeu pratuzumab-SN-38 (anti-CD22) em uma dose de 12 mg/kg semanais x 3, com uma semana de descanso, e em seguida repetiu o procedimento por mais dois ciclos. Uma semana mais tarde, o paciente foi avaliado por imagem de CT, e o volume total de seu tumor foi medido e apresentou uma diminuição de 35% (resposta parcial), que parece ter se mantido pelos próximos 3 meses. Os efeitos colaterais foram apenas trombocitopenia e vômito e náusea de nível 1, que

foram resolvidos em 2 semanas. Nenhuma pré-terapia para reduzir as reações à infusão foi dada.

Exemplo 37. Terapia de combinação do linfoma folicular com veltuzumabe e epratuzumabe-SN-38 na configuração de primeira terapia.

[00389] Uma mulher de 35 anos foi diagnosticada com linfoma folicular de baixo nível e com uma boa pontuação de FLIPI, apresentando em seus nódulos linfáticos cervicais tanto o de axila quanto de mediastino. Seu baço não estava aumentado e a biópsia da medula óssea não mostrou nenhum comprometimento por conta da doença. Ela não está muito afetada sintomaticamente, com apenas alguns períodos de elevada temperatura, suores à noite e fatiga um pouco acima do normal. Seu médico decidiu não submetê-la a um processo de observação, em vez disso, deu a essa mulher uma terapia menos agressiva, combinando um curso subcutâneo do anticorpo monoclonal humanizado anti-CD20, veltuzumabe, semanalmente, por 4 semanas (200 mg/m^2) combinado com dois cursos semanais do epratuzumabe-SN-38 anti-CD22, com cada infusão tendo uma dose de 8 mg/kg. Essa terapia de combinação foi repetida 2 meses mais tarde e, depois disso, a paciente foi avaliada por estudos de imagem de CT e FDG-PET e também passou por uma biópsia da medula óssea. Surpreendentemente, uma redução de aproximadamente 90% da doença foi notada, e ela recebeu então um novo curso dessa terapia de combinação após um descanso de 4 semanas. Uma avaliação 4 semanas depois mostrou uma resposta radiológica (e biópsia da medula óssea) completa. Seu médico decide repetir esse curso de terapia 8 meses mais tarde, e os testes radiológicos/patológicos mostram uma remissão completa sustentada.

Exemplo 38. Primeira terapia de linfoma folicular utilizando veltuzumabe-SN-38

[00390] O paciente é uma mulher de 41 anos apresentando linfoma folicular de baixo nível, com nódulos linfáticos axilares e cervicais bilaterais mensuráveis (2-3 cm cada), massa mediastinal de 4 cm de diâmetro e um baço aumentado. Ela recebeu 3 cursos de terapia veltuzumabe-SN-38 (anti-CD20-SN-38), com cada curso consistindo de 10 mg/kg infundido uma vez por semana, de 3 em 3 semanas. Após a conclusão da terapia, suas medições do tumor por CT mostraram uma redução de 80%. Ela recebeu então 2 cursos de terapia adicionais e as medições por CT indicaram que uma resposta completa foi obtida. Isso foi confirmado por imagem de FDG-PET.

Exemplo 39. Terapia de DLBCL reincidente com anticorpo humanizado 1F5 conjugado com SN-38

[00391] Uma mulher de 53 anos apresenta um linfoma recorrente amplo e difuso de célula-B em locais paraórticos abdominais e mediastinais 8 meses depois de apresentar uma resposta parcial à quimioterapia de R-CHOP dada por 6 ciclos. Ela recusou-se a passar por mais quimioterapias citotóxicas, então recebeu uma terapia mais amena, consistindo de 10 mg/kg do anticorpo monoclonal anti-CD20 1F5 humanizado, conjugado a aproximadamente 6 moléculas de SN-28 por molécula do anticorpo, uma vez por semana, em semanas intercaladas, por 5 infusões. Estudos de CT e FDG-PET indicam uma redução adicional de seus linfomas em 40%, assim, após um período de descanso de 4 semanas, a terapia foi prosseguida em uma dose de 8 mg/kg de 3 em 3 semanas para um total de 5 infusões. A avaliação de sua doença revela uma redução de aproximadamente 80%.

Exemplo 40: Terapia de leucemia linfocítica crônica recidivante com rituximabe-SN-38

[00392] Um homem de 62 anos com um histórico de 8 anos de CCL, tendo respondido no passado à terapia com fludarabina, ciclofosfamida e

rituximabe, e após recidiva, a ibrutinib por uma resposta parcial de duração de 9 meses, apresenta doença progressiva. Administra-se ao paciente monoterapia de rituximabe-SN-38 seguindo um programa de 12mg/kg a cada 2 semanas para 3 cursos, reduzido a 8 mg/kg quinzenalmente por mais 4 cursos. É observada melhoria continuada em citopenias, espelhada por mais de 50 % ou um nível de hemoglobina maior que 11 g por decilitro, uma contagem absoluta de neutrófilos maior de 1500 células por cmm, ou contagem de plaquetas maior que 11k/cmm, o que foi durável por cerca de 9 meses.

Exemplo 41: Primeira terapia de DLBCL com veltuzumabe-SN-38 combinado com bendamustina.

[00393] Um homem de 59 anos apresenta múltiplos sítios de DLBCL, incluindo nódulos linfáticos torácicos, abdominais e inguinais, e baço alargado, confirmado por CT, FDG-PET, e diagnósticos imunohistológicos/patológicos. Bendustina é administrada a uma dosagem de 90 mg/m² nos dias 1 e 2, em conjunto com o veltuzumabe-SN-38 a uma dosagem de 6 mg/kg nos dias 7 e 14, administrado a cada quatro semanas por 4 ciclos. Avaliações radiológicas subsequentes mostram uma resposta parcial. Após responso de 2 meses, a terapia é repetida por mais 2 ciclos, e a avaliação radiológica demonstra então resposta completa. Citopenias, o mais dos casos neutropenias, são manejáveis e não alcançam o nível 3.

Exemplo 42: Primeira terapia de linfoma de célula de manto (MCL) com veltuzumabe-SN-38 com lenalidomida.

[00394] O paciente é um homem de 68 anos diagnóstico com MCL após apresentar reclamações gastrointestinais e letargia. Uma colonoscopia revela uma massa cecal de 7 cm, e seus exames laboratoriais revelam que ele tem o Estágio IV da doença. Administra-se a ele uma terapia combinada de lenalidomida, 25 mg oralmente diariamente nos dias 1 a 21 a cada 28 dias.

Após dois ciclos, administra-se a ele veltuzumabe-SN-38 quinzenalmente a uma dosagem de 10 mg/kg por 3 tratamentos com repouso de 2 semanas. Isto é então repetido mais uma vez. Duas semanas após a conclusão desta terapia, o paciente mostra resposta parcial de sua lesão de índice mediano e redução de outros nódulos linfáticos é visualizada. Quatro meses mais tarde, a terapia com lenalidomida é repetida por 21 dias, seguido de 2 cursos de veltuzumabe-SN-38. Mostra-se, então, que sua doença reduziu-se ainda mais, muito embora a resposta ainda não seja completa.

Exemplo 43: Terapia com epratuzumabe-SN-38 de um paciente com linfoma difuso de grande célula B recidivante/refratário

[00395] Um homem de 65 anos com sintomas de perda de peso submete-se a uma biopsia da massa epigástrica, que é então diagnosticada como linfoma difuso de grande célula B. Ele é tratado com 6 ciclos de R-CHOP padrão (rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona). Ele apresenta neutropenia prolongada e persistente (700 ANC) com leve trombocitopenia (50-70k/mL), mas nenhuma anemia real. Seu IPI é elevado. A massa não epigástrica não mostra nenhuma mudança após esta terapia, e ele é então colocado em regime de tratamento brando com epratuzumabe-SN-38 anti-CD22. Este é um regime de 4 mg/kg infundido quinzenalmente por 4 infusões, e depois uma vez a cada três semanas por mais 3 infusões. Seu linfoma epigástrico é medido por CT uma semana depois e mostra notável redução de 52 %. O paciente prossegue com este tratamento a cada três semanas por mais 3 meses, e continua a exibir redução de sua massa de linfoma com estabilização de seu peso e melhorias em sua energia e atividades.

Exemplo 44: Terapia RFB4 humanizada de um paciente com linfoma folicular recidivante

[00396] Uma mulher de 42 anos apresenta dor aguda, constante e

severa na parte inferior do abdômen, que irradia para as costas. Testes laboratoriais são de pouca relevância, porém, um ultrassom do abdômen revela uma massa sólida heterogênea na região inferior esquerda anterior, medindo 7.5 x 6.2x 7.0 cm. Varreduras de CT exibem uma grande massa dentro dos limites do mesentério do intestino delgado à esquerda, com envolvimento de nódulos linfáticos adjacentes. Uma biópsia de agulha guiada por CT da massa mostra que trata-se de um linfoma folicular, grau 3. Imunohistoquímica mostra um tipo célula B com resultados positivos para CD19, CD20, CD22, Bcl-2 e Bcl-6. Estudos de PET não revelam nenhuma doença sobre o diafragma, na medula óssea ou no baço, mas a biópsia da medula óssea confirma envolvimento de um linfoma. O paciente submete-se a 6 ciclos de quimioterapia R-CHOP, resultando em resposta completa a esta terapia 4 meses mais tarde. Entretanto, 10 meses mais tarde, ela sofre uma recidiva, com recorrência de sua massa abdominal e nódulos linfáticos adjacentes, bem como o baço dilatado e mais envolvimento da medula óssea tal como determinado pelo PET e por estudos de biópsia. Ela começa agora um curso de terapia com o anticorpo monoclonal anti-CD22 humanizado, RFB4, conjugado com 6 SN-38 moléculas por IgG, a uma dosagem de 8 mg/kg semanalmente por 3 semanas, e depois continuado a 8 mg/kg quinzenalmente por mais 4 tratamentos. Duas semanas mais tarde, submete-se a estudos CT e FDG-PET, e suas lesões abdominais e baço mostram uma redução de 40 %, e uma diminuição geral do envolvimento da medula óssea. Após repouso de 4 semanas, implementa-se terapia a 4 mg/kg semanalmente por 4 semanas, seguido por 6 mg/kg quinzenalmente por mais 5 tratamentos, com redução adicional mensurável da soma de tamanhos de todas as lesões medidas em um total de 60 %. A paciente continua em terapia de manutenção de hRFB4-SN-38 de 8 mg/kg uma vez por mês durante os 5 meses seguintes, e mantém sua

resposta terapêutica.

Exemplo 45: Terapia com epratuzumabe-SN-38 de um paciente com leucemia linfoblástica aguda recidivante/refratária.

[00397] Um homem de 29 anos com leucemia linfoblástica aguda de célula B precursora CD22+ (ALL) não respondeu à terapia com PEG-asparagina, ciclofosfamida, daunorrubicina, citarabina (ara-C), vincristina, leucovorina, prednisona, metotrexato, e 6-mercaptopurina, e terapia secundária com G-CSF (Neupogen), administrados como terapia de indução/manutenção sob um protocolo Larson modificado. A leucemia do paciente é cromossomo Filadélfia-negativa. Com base nas contagens de blastos de leucemia do sangue e da medula óssea, o paciente exibe apenas mínima resposta, com a doença progredindo 4 meses depois. Administra-se a ele, então, uma dosagem semanal de epratuzumabe-SN-38 num programa inicial de 6 mg/kg por quatro semanas, e então reduzido a 6mg/kg quinzenalmente por 6 infusões adicionais. O paciente é então avaliado por blastos leucêmicos no sangue e na medula, bem como por meio de estudos FDG do tamanho do baço e do envolvimento da medula óssea, e aparentemente uma resposta parcial é atingida, com melhoria concomitante nos sinais e sintomas gerais do paciente. Esta terapia continua então ao longo dos 8 meses seguintes, mas a 5 mg/kg quinzenalmente, com 3 semanas de terapia e 2 de repouso, e uma remissão completa é alcançada. O paciente está sendo agora avaliado como candidato para transplante de célula-tronco hematopoiética.

Exemplo 46: Terapia humanizada com RFB4-SN-38 de um paciente com leucemia linfoblástica aguda recidivante/refratária.

[00398] Após não responder a HIDAC (terapia de ara-C em alta dosagem), este homem de 20 anos com leucemia linfoblástica aguda de célula B precursora recebe tratamento humanizado anti-CD22 com hRFB4 IgG

conjugado a SN-38 (média de 6 moléculas de droga por IgG), em um programa de dosagem de 10 mg/kg semanalmente por duas semanas, depois 1 semana de repouso, seguida de infusões de 10 mg/kg quinzenalmente por 5 tratamentos adicionais. O paciente submete-se então a avaliações para apurar presença de células blásticas leucêmicas no sangue e na medula, e exibe redução de 90 %. Após repouso de 4 semanas, este curso terapêutico é repetido, e a avaliação após 4 semanas exibe resposta total sem a mínima doença residual, conforme medido por PCR.

Exemplo 47: Terapia de consolidação com epratuzumabe-SN-38 em um paciente com DLBCL que está recebendo quimioterapia R-CHOP

[00399] Esta mulher de 56 anos com nódulos linfáticos cervicais e adenopatia cervical bilateral medindo 1.5 a 2.0 cm, bem como um nódulo linfático axilar direito de 3 cm, bem com nódulos linfáticos retroperitoneais e bilaterais pélvicos medindo 2.5 a 3.0 cm, é diagnosticada com linfoma difuso de célula B grande estágio 3 que é positivo para CD20 e CD22. Ela é colocada em regime quimioterápico R-CHOP padrão administrado a cada 21 dias com filgrastim e antibióticos profiláticos. Após receber 6 ciclos desta terapia, concede-se à paciente um período de repouso de 2 meses, e ela é então colocada em terapia de consolidação com 8 mg/kg epratuzumabe-SN-38, infundido quinzenalmente por 3 tratamentos. Embora a resposta após quimioterapia R-CHOP seja mínima (menos de 30 % de mudança em lesões medidas), a terapia de consolidação com epratuzumabe-SN-38 resulta em resposta parcial (diminuição de >50% na soma de todas as lesões index). Após repouso de 3 meses, este curso terapêutico com epratuzumabe-SN-38 é repetido, com paciente recebendo novamente filgrastim e antibióticos profiláticos, e mantém sua boa remissão.

Exemplo 48: Tratamento de câncer testicular metastático recidivante

com IMMU-31-SN-38

[00400] O paciente é um homem de 30 anos com um histórico de câncer testicular removido do testículo direito, com metástase sincrônica em ambos os pulmões, que responde bem à quimioterapia de combinação. No diagnóstico, seu grau sanguíneo de alfa-fetoproteína (AFP) encontra-se elevado a 1,110 ng/mL, mas diminui para 109 ng/mL após terapia bem-sucedida. Ele agora apresenta um grau de AFP gradualmente crescente ao longo de um período de 3 anos, de modo que varreduras CT e FDG-PET são realizadas, revelando recorrência de metástase pulmonar em ambos os pulmões. Ele recebe terapia com o anticorpo anti-AFB, IMMU-31 IgG, conjugado com SN-38 a 6 moléculas da droga por IgG. Ele recebe doses semanais de 12 mg/kg deste conjugado anticorpo-droga por 3 semanas de um ciclo de 4 semanas, repetido por outro ciclo, porém, com redução da terapêutica para 10 mg/kg. Isto é repetido então por mais 2 ciclos. Duas semanas mais tarde, exames radiológicos dos pulmões revelam que as metástases desapareceram. Seu grau de AFP no sangue é agora 18 ng/mL. O paciente retorna à atividade normal tendo conseguido resposta completa.

Exemplo 49: Tratamento de carcinoma hepatocelular metastático recidivante com IMMU-31-SN-38

[00401] Um homem de 58 anos com histórico de infecção por hepatite B, excesso de álcool e tabagismo, conduz primeiro a cirrose do fígado e depois a um diagnóstico de carcinoma hepatocelular. No momento em que se apresenta, após a remoção de uma porção de seu fígado, há ainda nódulos linfáticos regionais envolvidos. O paciente recebe um curso de terapia com sorafenib, indica alguma melhoria geral, mas não apresenta nenhuma redução de seu nódulo linfático regional ou de sua metástase de 2 pulmões (pulmão direito). CT do fígado sugere igualmente que pode estar ocorrendo recorrência

no parênquima do fígado restante. Agora são administrados a este paciente 3 cursos de terapia com IMMU-31-SN-38, cada um compreendendo programa de 16 mg/kg semanais por 2 semanas de um ciclo de 4 semanas. Após os 3 cursos compreendendo 6 doses, o paciente é reavaliado e apresenta diminuição em seu grau de AFP circulatório do valor de base de 2,000 ng/mL para 170 ng/mL, bem como uma redução de 20 % da soma de suas lesões índice medidas. Após repouso de 2 meses, institui-se outro curso de terapia de 3 ciclos, mas com uma redução da dose a 1 mg/kg por infusão. Um mês mais tarde, há redução ainda maior de toda a lesão medida, a 35 % do valor de base, bem como leve diminuição no grau de AFP no sangue a 100 ng/mL. O paciente está sob tratamento de manutenção de uma dose por mês enquanto não houver avanço da doença ou toxicidades restritivas.

Exemplo 50: Armazenamento de imunoconjugados

[00402] Os conjugados descritos no Exemplo 8 foram purificados e seus tampões foram trocados por ácido 2-(N-morfolino)etanesulfônico pH 6.5, e formulado ainda mais com trealose (concentração final de 25 mM) e polissorbato 80 (concentração final de 0.01 % v/v), com a concentração de tampão final tornando-se 22.25 mM como resultado de acréscimo de excipiente. Os conjugados formulados foram liofilizados e armazenados em fracos vedados, com armazenamento a 2 °C – 8 °C. Os imunoconjugados liofilizados permaneceram estáveis sob as condições de armazenamento e mantiveram suas atividades fisiológicas.

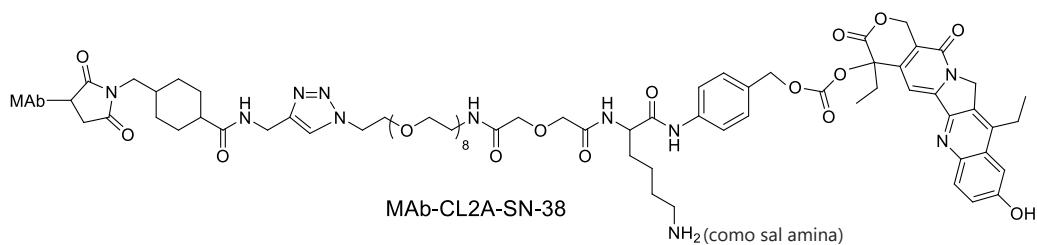
* * *

[00403] A partir da descrição acima, um indivíduo versado na técnica pode facilmente determinar as características essenciais da presente invenção e, sem afastar-se do espírito e do escopo da mesma, pode fazer várias alterações e modificações da invenção para adaptá-la a vários usos e condições

sem experimentação indevida. Todas as patentes, pedidos de patente e as publicações citados neste documento são incorporados em sua totalidade neste documento à guisa de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um imunoconjugado compreendendo SN-38 conjugado a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a EGP-1 (TROP-2), **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar um câncer de mama triplo negativo refratário (TNBC) em um indivíduo humano a uma dosagem entre 8 mg/kg e 10 mg/kg, em que a estrutura do imunoconjugado é MAb-CL2A-SN38:



e em que o anticorpo é um anticorpo humanizado que compreende sequências de região determinante de complementariedade (CDR) de cadeia leve CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 90); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 91); e CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 92) e sequências CDR de cadeia pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 93); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO: 94) e CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 95).

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a dosagem é selecionada a partir do grupo que consiste em 8 mg/kg, 9 mg/kg e 10 mg/kg.

3. Uso de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a dosagem é 10 mg/kg.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humanizado é hRS7.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido e o tratamento resulta em uma redução do tamanho do tumor em pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30% ou pelo menos

40%.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é metastático.

FIG. 1

Eficácia terapêutica dos imunocomjugados Mab-CL2A-SN38 em camundongos portadores de tumor Capan-1 (250 µg duas vezes semanais por 4 semanas), n=9-10

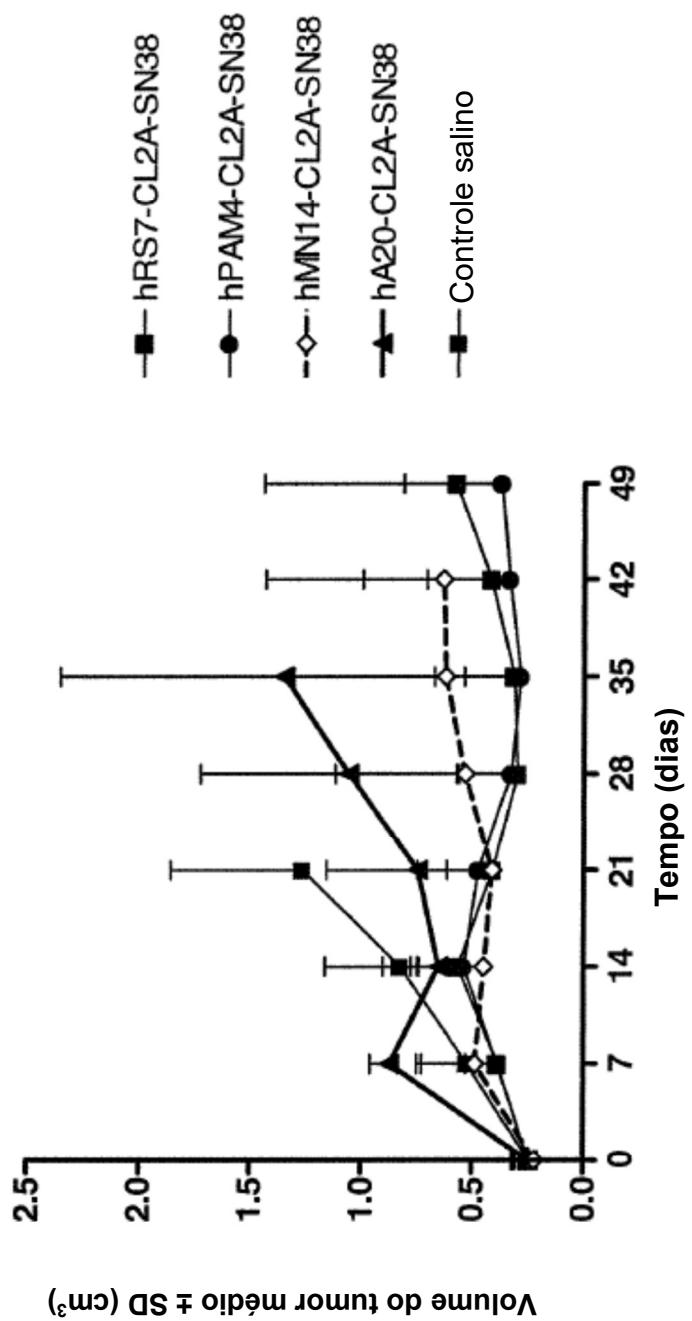


FIG. 2

Eficácia terapêutica dos imunoconjungados Mab-CL2A-SN38 em camundongos portadores de Xenoenxerto de Adenocarcinoma Pancreático Humano (BxPC-3) (500 µg duas vezes semanais por 4 semanas), n=10

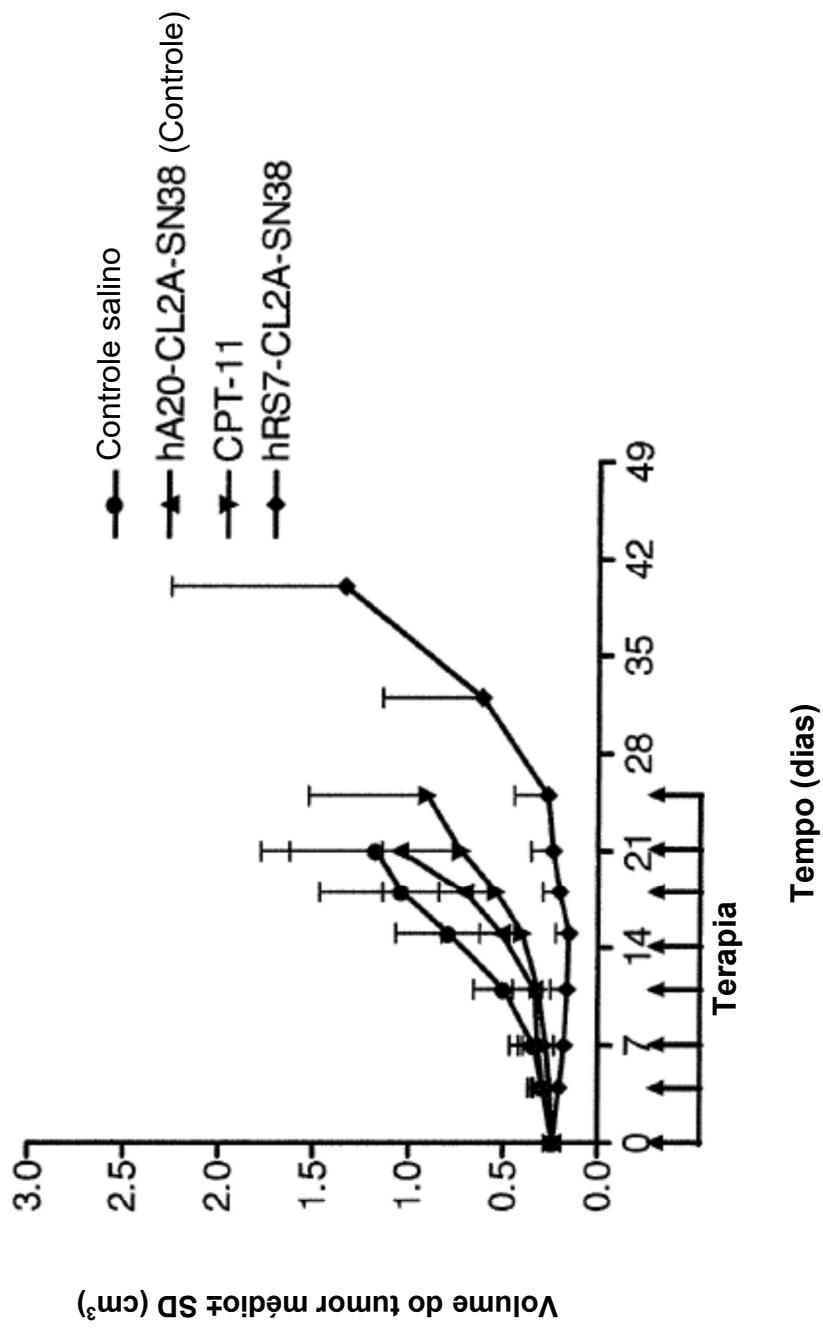


FIG. 3

Eficácia terapêutica de imunoconjungados Mab-CL2A-SN38 em camundongos portadores de Xenoenxerto de Adenocarcinoma Panreatico Humano (BxPC-3) (500 µg duas vezes semanais por 4 semanas), n=10

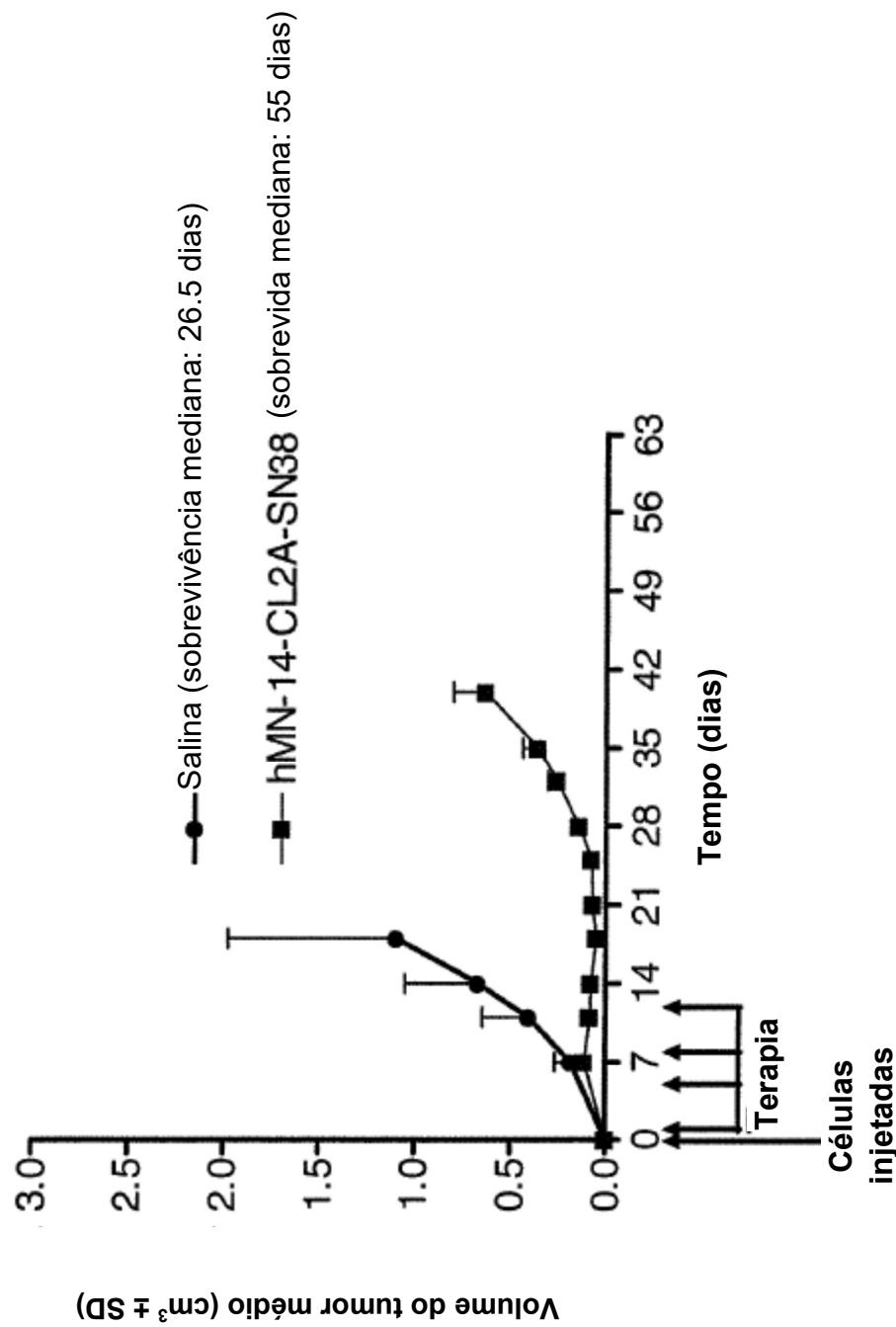


FIG. 4

Curvas de sobrevida de camundongos tratados com Hmn14-CL-SN38 portadores de doença metastática pulmonar GW (i.p. q4dx8)

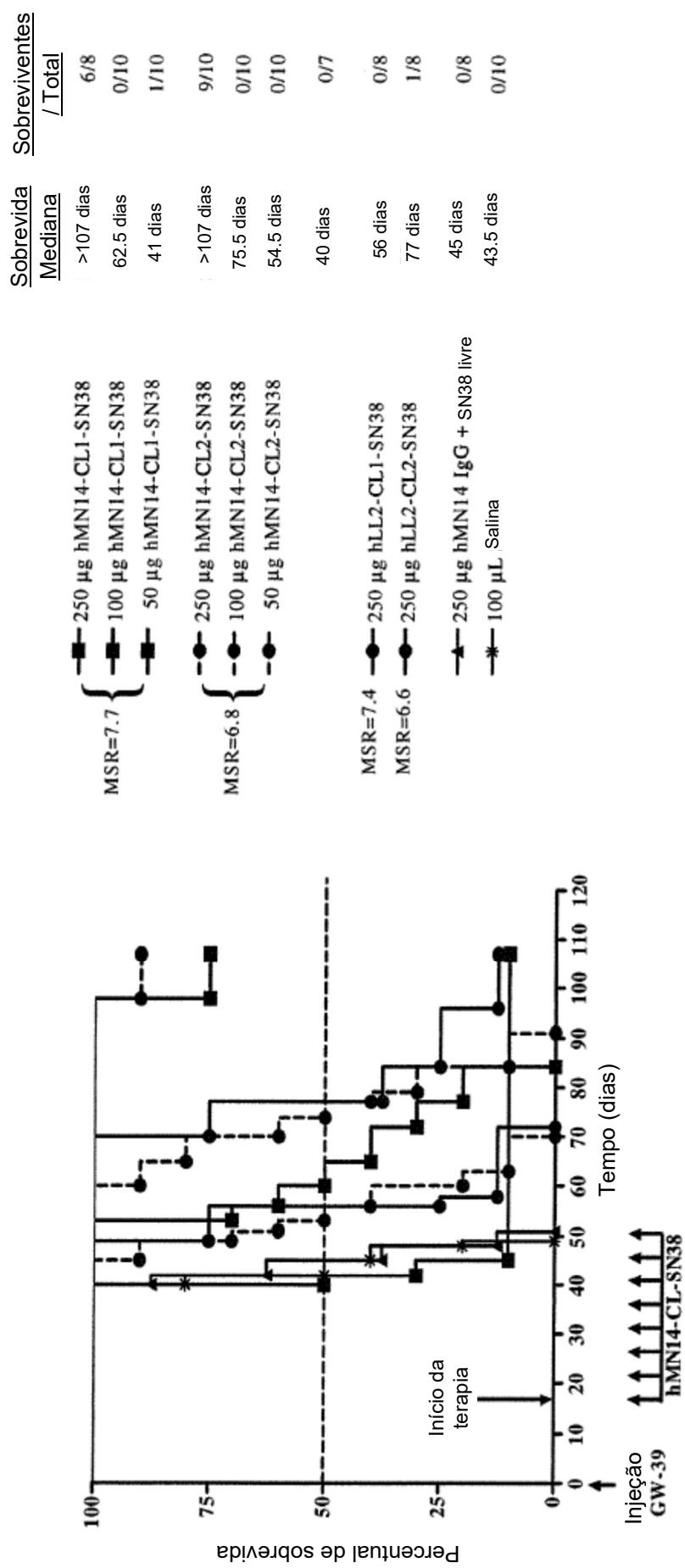


FIG. 5

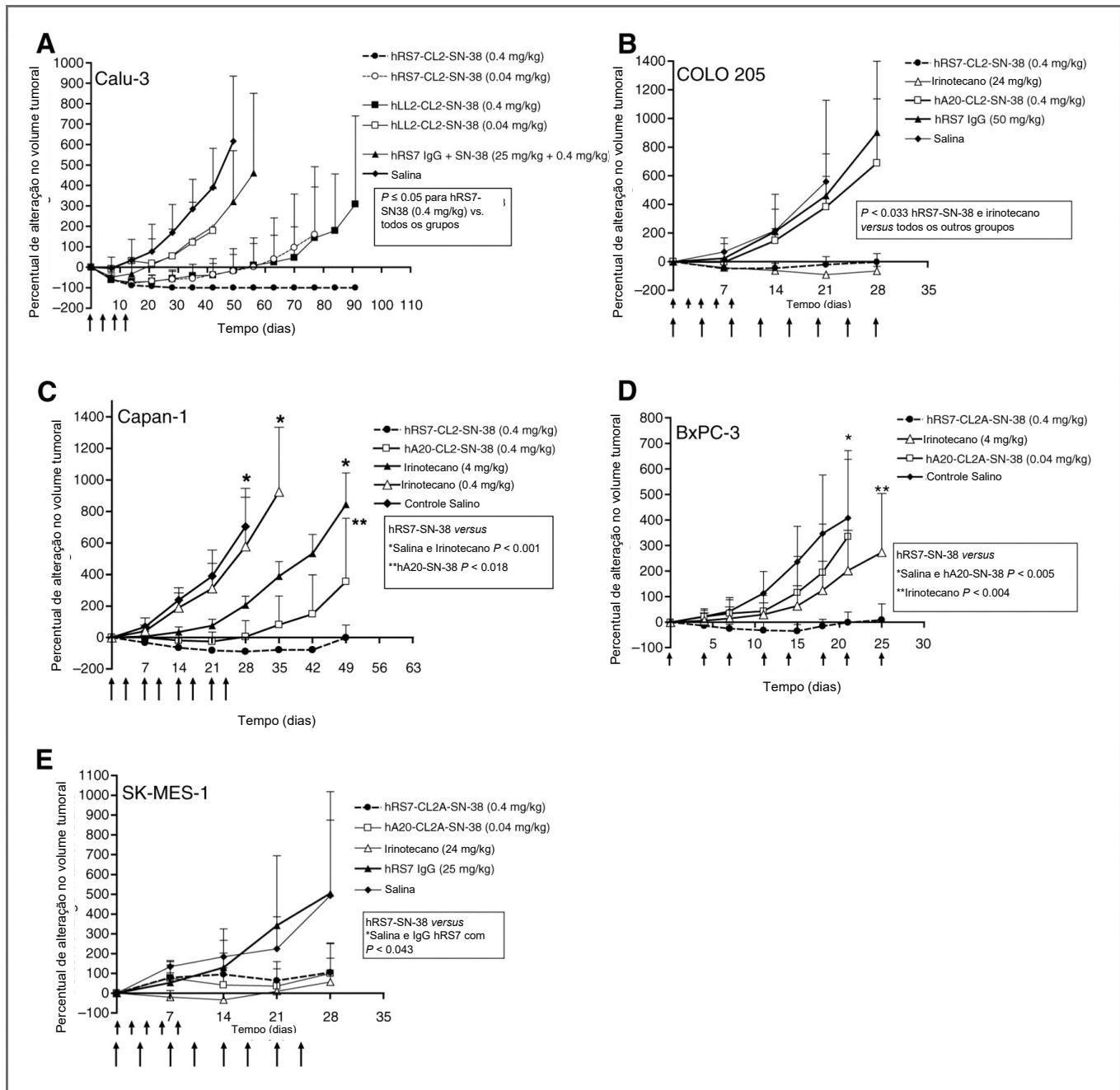


FIG. 6

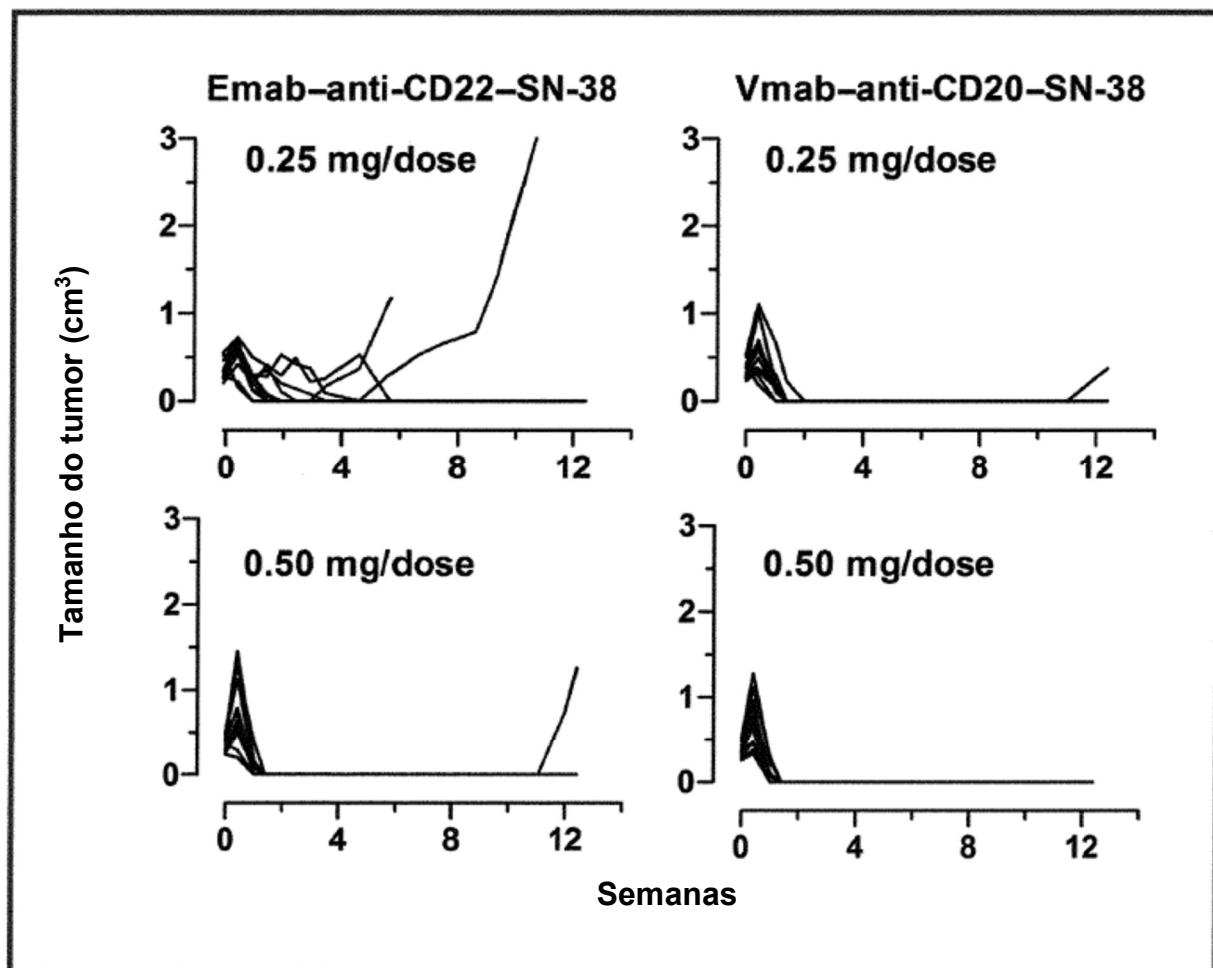


FIG. 7

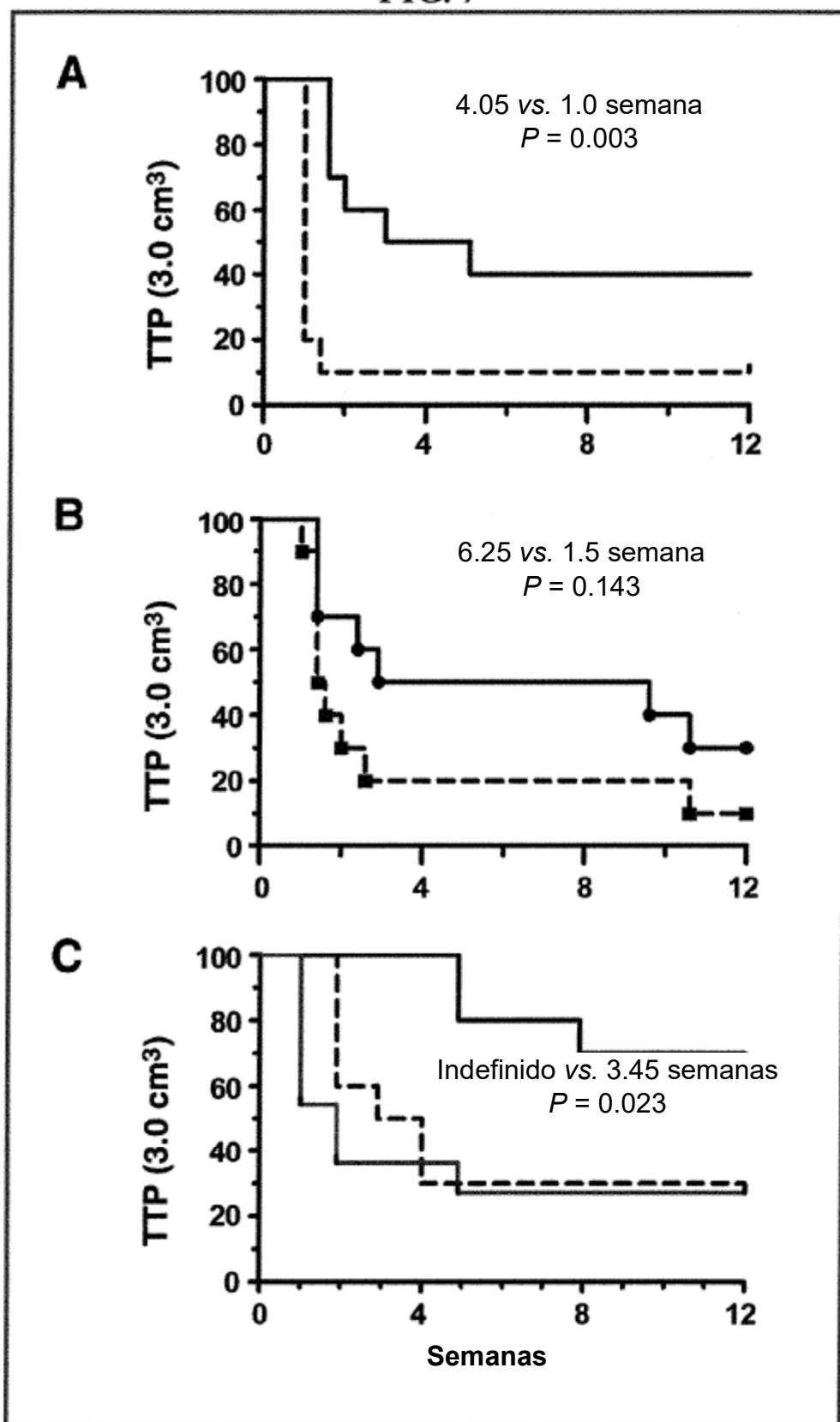


FIG. 8

Labetuzumab-SN-38: Paciente 009

Histórico Cirúrgico, Terapia Quimio/MAb

