



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 1 2 0 1 5 0 1 8 8 9 9 B 1 *

(11) BR 112015018899-0 B1

(22) Data do Depósito: 07/02/2014

(45) Data de Concessão: 26/09/2023

(54) Título: IMUNOCONJUGADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ANTICORPOS IGG MODIFICADOS OU FRAGMENTOS DE ANTICORPO MODIFICADOS DOS MESMOS E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, E CÉLULA HOSPEDEIRA

(51) Int.Cl.: C07K 16/30; A61P 35/00; A61K 47/00.

(30) Prioridade Unionista: 08/02/2013 US 61/762,563.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): BERNHARD HUBERT GEIERSTANGER; WEIJIA OU; TETSUO UNO.

(86) Pedido PCT: PCT US2014015393 de 07/02/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/124316 de 14/08/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 06/08/2015

(57) Resumo: IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ANTICORPO MODIFICADO OU FRAGMENTO DE ANTICORPO DO MESMO, ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO MODIFICADO OU FRAGMENTO DE ANTICORPO E USO DE UM IMUNOCONJUGADO. A presente invenção fornece sítios específicos para a modificar anticorpos ou fragmento de anticorpos substituindo-se pelo menos um aminoácido nativo na região constante de um anti corpo parental ou fragmento de anticorpo com cisteína, que pode ser empregado como um sítio de ligação para uma carga útil ou combinação de ligante-carga útil.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“IMUNOCONJUGADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
ANTICORPOS IGG MODIFICADOS OU FRAGMENTOS DE
ANTICORPO MODIFICADOS DOS MESMOS E SEU MÉTODO DE
PRODUÇÃO, E CÉLULA HOSPEDEIRA”.**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Devido à importância de anticorpos para várias aplicações terapêuticas, existe uma necessidade de métodos robustos para seletivamente modificar anticorpos para introduzir propriedades melhoradas ou funções adicionais. A invenção fornece sítios específicos para ligar porções a anticorpos para preparar anticorpos modificados, tal como para uso na preparação de conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs). Os sítios de conjugação seletiva são localizados em regiões constantes do anticorpo e, desse modo, são úteis com vários anticorpos.

ANTECEDENTE

[002] O valor de métodos para modificação de anticorpos é bem conhecido, e muitos métodos para a conjugação de anticorpos para ligar várias porções de “carga útil” foram desenvolvidos. Muitos destes métodos contam com a ocorrência natural de resíduos de aminoácido reativo específico no anticorpo, tal como lisina e cisteína, que pode ser usado para ligar uma carga útil. Entretanto, contar com os aminoácidos nativos não é sempre desejável, porque a localização e a quantidade de carga útil ligada dependem do número e posição daqueles aminoácidos reativos: muito ou pouco de tais resíduos torna difícil eficientemente controlar o carregamento da carga útil no anticorpo. Além disso, a colocação dos aminoácidos reativos pode tornar difícil obter completa conjugação, resultando em produtos heterogêneos durante a conjugação. A heterogeneidade de um ingrediente ativo farmacêutico, por exemplo, é tipicamente indesejável

porque ele compõe a imprevisibilidade de administração de um fármaco a uma população heterogênea de indivíduos: é muito preferível administrar um produto homogêneo, e muito mais difícil totalmente caracterizar e prever o comportamento de um heterogêneo. A conjugação específica do sítio de um fármaco citotóxico a um anticorpo por meio, por exemplo, de resíduos de cisteína construídos resulta em imunocombinados homogêneos que exibem índice terapêutico melhorado (Junutula *et al.*, (2008) *Nat Biotechnol.* 26(8):925-932)).

[003] Anticorpos foram construídos para adicionar certos resíduos tipo cisteína em posições específicas, onde estes resíduos podem ser usados para conjugação (Lyons *et al.*, (1990) *Protein Eng.*, 3:703-708), porém o valor de substituições específicas pode variar com certos anticorpos, visto que a cisteína construída pode interferir com a duplicação do anticorpo e oxidação das ligações de dissulfeto intramoleculares apropriadas (Voynov *et al.*, (2010) *Bioconjug. Chem.* 21(2): 385-392).

[004] Porque as cisteínas construídas em anticorpos expressos em células mamíferas são modificadas por meio de ligações de dissulfeto com glutatona (GSH) e/ou cisteína durante sua biossíntese (Chen *et al.* (2009) *mAbs* 1:6, 563-571), a(s) cisteína(s) modificada(s) no produto de combinado de fármaco de anticorpo como inicialmente expressa(s) é(são) não reativa(s) a reagentes reativos de tiol. A ativação da(s) cisteína(s) construída(s) requer a redução do aduto de GSH e/ou cisteína (que tipicamente resulta em redução de todas as ligações de dissulfeto intercadeia do anticorpo), seguida por reoxidação e reformação das ligações de dissulfeto intercadeia nativas antes da conjugação (Junutula *et al.*, (2008) *Nat. Biotechnol.* 26(8):925-32). Alguns dos sítios onde a cisteína foi inserida interferem com o processo de reoxidação e subsequentemente resultam em

produtos de conjugação não homogêneos indesejáveis. É, portanto, importante identificar sítios no anticorpo onde a cisteína introduzida não interfere com o processo de reoxidação antes da conjugação com um reagente reativo de tiol, tais como grupos maleimida ou bromo-, cloro- ou iodo-acetamida.

[005] Conjugação de resíduos de cisteína com bromo-acetamida, iodo-acetamida ou cloro-acetamida resulta na formação de uma ligação de tio éter estável. (Alley *et al.*, (2008) *Bioconjug Chem.* 19(3):759-65). Entretanto, a química é menos eficiente do que a química de conjugação de maleimida. Visto que a formação de tais ligações de tiol-maleimida é um método popular e altamente eficiente para uso quando ligando a carga útil ou ligante à cisteína, existe uma necessidade de identificar sítios de substituição de cisteína em um anticorpo onde ligações de maleimida podem ser usadas. Mais importante, imunocombinados especificamente combinados ao sítio podem exibir índice terapêutico melhorado, desse modo aí permanece uma necessidade de identificar sítios privilegiados específicos para substituição de cisteína em anticorpos. O que torna possível a conjugação de cargas úteis sobre anticorpos para formar eficientemente, e que fornecem combinados tendo alta estabilidade. A presente invenção fornece tais sítios de substituição de cisteína privilegiados que fornecem anticorpos melhorados para os propósitos de conjugação e imunocombinados compreendendo tais anticorpos melhorados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A invenção fornece sítios específicos na região constante de um anticorpo ou fragmento de anticorpo no qual a substituição de cisteína ("Cys") do aminoácido nativo em um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo pode ser realizada a fim de fornecer um resíduo Cys para ligação de uma porção química (por exemplo, carga

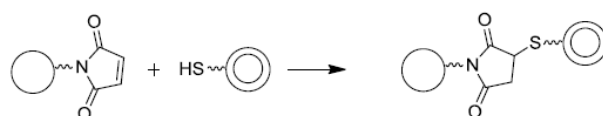
útil/porção de fármaco) para formar um imunocjugado com boa eficiência e estabilidade. A invenção também fornece anticorpos construídos ou fragmento de anticorpos tendo um ou mais resíduos Cys em um ou mais destes sítios específicos, bem como imunocjugados feitos de tais anticorpos construídos ou fragmento de anticorpos.

[007] Métodos para inserir Cys em localizações específicas de um anticorpo são conhecidos na técnica, veja, por exemplo, WO 2011/005481. Entretanto, a presente invenção descreve sítios específicos na região constante de anticorpos ou fragmento de anticorpos onde a substituição de um ou mais aminoácidos nativos de um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo com Cys fornece uma ou mais das seguintes vantagens: Boa reatividade para promover eficiente imunocjugação; propensão reduzida para perda de carga útil quando um ligante de conjugação de Cys-maleimida é usado; uma tendência reduzida para formar ligações de dissulfeto indesejadas, tal como ligação cruzada entre anticorpos ou a formação de ligações de dissulfeto intramoleculares não nativas; e baixa hidrofobicidade do ADC resultante.

[008] Os sítios privilegiados específicos para substituição de Cys de aminoácidos nativos na região constante de um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo são selecionados para fornecer eficiente conjugação, ao mesmo tempo em que minimizando os efeitos indesejados. Primeiro, os sítios específicos para modificação são selecionados de modo que a substituição do aminoácido nativo de um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo com Cys em um ou mais das localizações selecionadas forneça anticorpos ou fragmento de anticorpos que são facilmente conjugados na nova cisteína. As localizações específicas são selecionadas para serem suficientemente acessíveis à superfície para permitir a sulfidril do resíduo de cisteína

ser reativa a eletrófilos em soluções aquosas. A identificação de sítios adequados para substituição de sítios para substituição de Cys de aminoácidos nativos de um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo envolveu a análise de exposição de superfície dos aminoácidos nativos com base nos dados de estrutura cristal. Por que os sítios descritos aqui são suficientemente acessíveis e reativos, eles podem ser usados para formar imunocombinados por meio de química que é bem conhecida na técnica para modificar resíduos de cisteína de ocorrência natural. A conjugação dos resíduos Cys de substituição desse modo usa métodos convencionais.

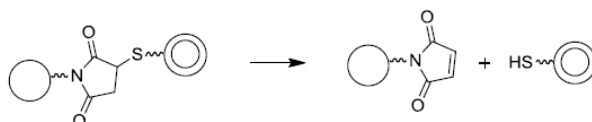
[009] Sítios de modificação selecionados podem mostrar uma baixa propensão à reversão de conjugação quando porções de tiol-maleimida são usadas na conjugação. A reação de conjugação de tiol-maleimida é frequentemente altamente seletiva e extremamente eficiente, e pode ser usada ou para ligar uma carga útil ao tiol de um resíduo de cisteína de uma proteína ou como um ligante em outro lugar na ligação entre a proteína e carga útil. Por exemplo, uma maleimida pode ser ligada a uma proteína (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo), e a carga útil tendo um tiol ligado pode ser adicionada à maleimida para formar um combinado:



[0010] Consequentemente, nesta etapa de conjugação, a proteína (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo) pode ser ou o círculo simples ou o círculo duplo; na outra representaria a carga útil. A informação de estabilidade de imunocombinado aqui especificamente refere-se à conjugação da cisteína substituída por reação com um grupo maleimida. Em algumas modalidades, o tiol é de uma cisteína sobre uma proteína (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo), desse modo o círculo duplo representa a proteína e o

círculo simples representa a carga útil.

[0011] Enquanto a reação tiol-maleimida é frequentemente usada para preparar conjugados, reversão da etapa de conjugação como representado abaixo pode resultar em perda de carga útil ou embaralhamento de carga útil com outras espécies contendo tiol:



[0012] Foi também reportado que alguns sítios para substituição de cisteína fornecem conjugados de maleimida mais estável do que outros, presumivelmente por que o ambiente químico local em certos pontos na superfície do anticorpo em torno de uma nova cisteína pode promover a hidrólise do anel de succinimida e, portanto, prevenir a reversão da ligação de tiol-maleimida no imunoc conjugado (Shen *et al.* (2012), *Nat. Biotechnol.* 30(2):184-9). A identificação dos sítios vantajosos para atender a este critério envolveu a inserção de Cys em lugar de muitos dos aminoácidos nativos tendo exposição de superfície adequada, formando imunoc conjugados contendo uma ligação de tiol-maleimida, e avaliando a estabilidade do imunoc conjugado a fim de eliminar sítios onde a estabilidade do conjugado foi reduzida pelo microambiente local em torno dos sítios desestabilizantes. Por causa disto, uma química que pode ser usada para unir ligantes e cargas úteis para a substituição de resíduos de Cys não está limitada pelos problemas de estabilidade associados com a reversibilidade de conjugados de tiol-maleimida que é descrita acima. Diversos métodos podem ser usados para formar conjugados em cisteína, incluindo conjugação de maleimida. Os sítios para substituição de cisteína descritos aqui promovem a estabilidade do produto de conjugado de anticorpo quando usando um dos métodos de conjugação mais comuns, tornando estes sítios mais vantajosos

para construção de anticorpo, por que o anticorpo modificado pode ser usado com a metodologia de conjugação de maleimida altamente eficiente bem conhecida. Seleção de sítios com base neste critério é ilustrada por dados apresentados na Tabela 22 e Exemplo 9.

[0013] Sítios selecionados podem ser posicionados a fim de minimizar a formação de dissulfeto indesejada que pode interferir com a formação de um conjugado homogêneo. Quando anticorpos ou fragmento de anticorpos contendo cisteínas construídas são produzidos em células mamíferas, os resíduos de Cys estão tipicamente presentes como dissulfetos para um aminoácido de Cys livre ou para glutathione (Chen *et al.*, (2009) *mAbs* 16, 353-571). Para liberar os resíduos de Cys para conjugação com grupos reativos de tiol, o anticorpo ou fragmento de anticorpo necessita ser reduzido, rompendo todas as ligações de dissulfeto. O anticorpo ou fragmento de anticorpo é então reoxidado sob condições que facilitam a formação dos dissulfetos nativos que estabilizam o anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em reoxidação, resíduos de cisteína que são bastante proeminentemente expostos sobre a superfície do anticorpo ou fragmento de anticorpo podem formar dissulfetos por reação com Cys em outro anticorpo ou fragmento de anticorpo (“dissulfetos interanticorpo”), ou formando dissulfetos intra-anticorpo indesejados. Foi descoberto que resíduos de cisteína colocados nos sítios específicos descritos aqui são adequadamente acessíveis para ficarem disponíveis para eficiente conjugação, porém suficientemente protegidos ou adequadamente posicionados para reduzir ou eliminar a formação de ligações de dissulfeto interanticorpo e intra-anticorpo que de outro modo ocorreriam durante os procedimentos de redução / reoxidação tipicamente necessários quando expressando anticorpos modificados por cys. Similarmente, após reoxidação alguns sítios foram descobertos produzirem produtos de conjugação não

homogêneos que parecem ser devido à localização do novo resíduo de Cys construído na proteína, e os sítios específicos identificados aqui são aqueles onde tal heterogeneidade é minimizada.

[0014] A conjugação de cargas úteis de fármaco, em sítios onde elas são sequestradas de interações e ligação de solvente, pode aumentar a hidrofobicidade do anticorpo quando a ligação de fármaco é preferida visto que a redução da hidrofobicidade de um fármaco de proteína é geralmente considerada benéfica por que ela pode reduzir a agregação e depuração de circulação. A seleção de sítios de ligação que resultam em mínimas mudanças em hidrofobicidade pode ser particularmente benéfica quando 4, 6 ou 8 fármacos são ligados por anticorpo, ou quando particularmente cargas úteis hidrofóbicas são usadas.

[0015] Sítios para a incorporação de Cys foram avaliados usando estes e adicionais métodos descritos nos exemplos inclusos aqui, levando à seleção de sítios preferidos para a incorporação de Cys para construir anticorpos ou fragmentos de anticorpo para introduzir Cys como um sítio para conjugação, especialmente para preparar ADCs. Detalhes adicionais considerando a seleção dos sítios específicos para substituir um aminoácido natural de um anticorpo com Cys são fornecidos aqui.

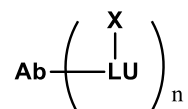
[0016] Sítios de substituição de cisteína são localizados na região constante de um anticorpo ou fragmento de anticorpo, e são identificados usando convenções de numeração padrão. É bem conhecido, entretanto, que porções ou fragmentos de anticorpos podem ser usados para muitos propósitos em vez de anticorpos de tamanho natural intactos, e também que anticorpos podem ser modificados de várias maneiras que afetam a numeração de sítios na região constante mesmo se eles não afetarem substancialmente o funcionamento da região constante. Por exemplo, a inserção de um

rótulo S6 (um peptídeo curto) em uma região alça de um anticorpo foi mostrada permitir a atividade do anticorpo ser mantida, mesmo se mudasse a numeração de muitos sítios no anticorpo. Consequentemente, enquanto que os sítios de substituição de cisteína preferidos descritos aqui são identificados por um sistema de numeração padrão com base em numeração de anticorpo intacto, a invenção inclui os correspondentes sítios em fragmentos de anticorpo ou em anticorpos contendo outras modifications, tal como a inserção de rótulo de peptídeo. Os correspondentes sítios naqueles fragmentos ou anticorpos modificados são desse modo sítios preferidos para substituição de cisteína em fragmentos ou anticorpos modificados, e referências aos sítios de substituição de cisteína por número incluem sítios correspondentes em anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos que retêm a função da porção relevante do anticorpo de tamanho natural.

[0017] Um sítio correspondente em um fragmento de anticorpo ou anticorpo modificado pode ser facilmente identificado por alinhamento de um segmento do fragmento de anticorpo ou anticorpo modificado com o anticorpo de tamanho natural para identificar o sítio no fragmento de anticorpo ou anticorpo modificado que se compara a um dos sítios de substituição de cisteína preferidos da invenção. O alinhamento pode ser com base em um segmento suficientemente longo para assegurar que o segmento compara-se com a porção correta do anticorpo de tamanho natural, tal como um segmento de pelo menos 20 resíduos de aminoácido, ou pelo menos 50 resíduos, ou pelo menos 100 resíduos, ou pelo menos 150 resíduos. O alinhamento pode também levar em consideração outras modificações que podem ter sido construídas no fragmento de anticorpo ou anticorpo modificado, desse modo diferenças em sequência devido a mutações de ponto construídas no segment usado para alinhamento,

particularmente para substituições conservativas, seriam permitidas. Desse modo, por exemplo, um domínio de Fc pode ser excisado de um anticorpo, e conteria resíduos de aminoácido que correspondem aos sítios de substituição de cisteína descritos aqui, a despeito das diferenças de numeração: sítios no domínio de Fc correspondendo aos sítios de substituição de cisteína da invenção seriam também esperados serem sítios vantajosos para substituição de cisteína no domínio de Fc, e são incluídos no escopo da invenção.

[0018] Em uma modalidade, a invenção fornece um imunocombinado de fórmula (I):



em que Ab representa um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína em um dos sítios de substituição de cisteína preferidos descritos aqui;

[0019] LU é uma Unidade Ligante como descrito aqui;

[0020] X é uma carga útil ou porção de fármaco;

[0021] e n é um número inteiro de 1 a 16.

[0022] Tipicamente em compostos de fórmula (I), LU é ligado a uma cisteína em um dos sítios de substituição de cisteína descrito aqui, X é uma porção de fármaco tal como um fármaco anticâncer, e n é 2-8 quando Ab é um anticorpo, ou n pode ser 1-8 quando Ab é um fragmento de anticorpo.

[0023] Em uma modalidade, a invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 121, 124, 152, 171, 174, 258,

292, 333, 360, e 375 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

[0024] Em uma modalidade, a invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana.

[0025] Em uma modalidade, a invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 143, 147, 159, 163, e 168 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve lambda humana.

[0026] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína nas posições descritas aqui. Os sítios para substituição de cisteína estão nas regiões constantes do anticorpo e são, desse modo, aplicáveis a uma variedade de anticorpos, e os sítios são selecionados para fornecer combinados estáveis e homogêneos. O anticorpo modificado ou fragmento pode ter duas ou mais substituições de cisteína, e estas

substituições podem ser usadas em combinação com outros métodos de conjugação e modificação de anticorpo como descrito aqui.

[0027] Em uma modalidade, a invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo o imunoconjugado descrito acima, e métodos para uso dos imunoconjugados.

[0028] Em uma modalidade, a invenção fornece um ácido nucleico codificando o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo descrito aqui tendo pelo menos uma substituição de cisteína em um sítio descrito aqui. A invenção também fornece células hospedeiras compreendendo estes ácidos nucleicos e métodos de uso do ácido nucleio ou células hospedeiras para expressar e produzir os anticorpos ou fragmentos descritos aqui.

[0029] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para selecionar um aminoácido de um anticorpo que é adequado para substituição por cisteína para fornecer um bom sítio para conjugação, compreendendo:

(1) identificar aminoácidos na região constante do anticorpo que tem uma exposição de superfície adequada para fornecer um grupo de sítios candidatos iniciais;

(2) para cada sítio candidato inicial, expressar um anticorpo em que o aminoácido nativo naquele sítio é substituído por cisteína;

(3) para cada anticorpo expresso, determinar se a proteína expressa é substancialmente homogênea após redução e reoxidação para fornecer a funcional anticorpo tendo uma cisteína livre no sítio candidato inicial;

(4) para cada proteína expressa que é substancialmente homogênea e funcional, conjugar a cisteína no sítio candidato inicial com uma porção maleimida e determinar se a ligação tiol-maleimida é estável naquele sítio;

(5) remover do grupo de sítios candidatos iniciais aqueles

sítios para os quais o anticorpo expresso não é substancialmente homogêneo e funcional, e aqueles em que a ligação tiol-maleimida é desestabilizada, para fornecer um grupo de sítios favorecidos para substituição de cisteína.

[0030] Opcionalmente, o método também compreende uma etapa de determinação da temperatura de fusão para o conjugado de cada sítio de substituição de cisteína favorecido, e eliminação do grupo de quaisquer sítios onde a substituição e conjugação de cisteína causa a temperatura de fusão diferir em 5°C ou mais daquela do anticorpo nativo.

[0031] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para produzir um imunocombinado, que compreende ligar uma Unidade Ligante (LU) ou uma combinação de Unidade Ligante-Carga Útil (-LU-X) a um resíduo de cisteína em um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que a cisteína é localizada em um sítio de substituição de cisteína selecionado de 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360, e 375 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

[0032] Outros aspectos e modalidades da invenção são descritos em maiores detalhes aqui.

1. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante em um sítio selecionado de posições 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334, 360, 375, e 392 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

2. O imunoconjugado da modalidade 1, em que a substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína é selecionada das posições 121, 124, 152, 258, 334, 360, e 392.

3. O imunoconjugado das modalidades 1 ou 2, em que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 5, 10, 17, 18, 29, 35, 42, 43, 48, 50, 54, 290, 291, 292, 293, 294, e 295.

4. Um imunoconjugado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante em um sítio selecionado de posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

5. O imunoconjugado da modalidade 4, em que a substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína é selecionada das posições 145 ou 165.

6. O imunoconjugado da modalidade 4, em que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 61, 62, 69, 71, 75, 76, e 77.

7. Um imunoconjugado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante em um sítio selecionado de posições 143, 147, 159, 163, e 168 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo

com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana.

8. O imunocjugado da modalidade 7, em que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 92, 94, 96, 97, e 98.

9. O imunocjugado da modalidade 1, 2, ou 3, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo também compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante em um sítio selecionado de posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

10. O imunocjugado da modalidade 1, 2, ou 3, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo também compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada de posições 143, 147, 159, 163, e 168 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições de cadeia leve são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

11. Um imunocjugado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma combinação de substituições de dois ou mais aminoácidos com cisteína em uma região constante de uma cadeia pesada nas posições 152 e 375, ou nas posições 327 e 375, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

12. Um imunocjugado compreendendo um anticorpo

modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma combinação de substituições de dois ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes compreendendo a posição 107 de uma cadeia leve e 360 de uma cadeia pesada, em que a referida cadeia leve é uma cadeia capa, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

13. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada de posições 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 e 422 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

14. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada de posições 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, e 203 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

15. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma

substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína selecionada de posições 143, 145, 147, 156, 159, 163, e 168 em sua região constante de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana.

16. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma combinação de substituições de dois ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes em que as combinações compreendem substituições nas posições 375 de um anticorpo cadeia pesada e posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo, ou na posição 334 de um anticorpo cadeia pesada na posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo, e em que a referida cadeia leve é a cadeia capa, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

17. O imunocombinado de quaisquer modalidades 11, 12, e 16 em que a relação de anticorpo de fármaco é de cerca de 4.

18. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma combinação de substituição de três ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes em que as combinações compreendem substituições selecionadas de

a. Posições 375 e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo e posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo,

b. Posições 334 e 375 de uma cadeia pesada de anticorpo e posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo, e

c. Posições 334 e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo

e posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo,

e em que a referida cadeia leve é a cadeia capa, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

19. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma combinação de substituição de três ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes em que as combinações compreendem substituições selecionadas de

- a. Posições 152, 375 e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo,
 - b. Posições 152, 334 e 375 de uma cadeia pesada de anticorpo, e
 - c. Posições 152, 334 e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo,
- e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

20. Os imunocombinados das modalidades 18 ou 19 em que a relação de anticorpo de fármaco é de cerca de 6.

21. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma combinação de substituição de quatro ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes em que as combinações compreendem substituições nas posições 334, 375, e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo e posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo, ou nas posições 333, 375, e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo e na posição 165 de uma cadeia leve de anticorpo, e em que a referida cadeia leve é a cadeia capa, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

22. Um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo

compreende uma combinação de substituição de quatro ou mais aminoácidos com cisteína sobre suas regiões constantes em que as combinações compreendem substituições nas posições 152, 334, 375, e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo, ou nas posições 152, 333, 375, e 392 de uma cadeia pesada de anticorpo, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU. 23. Os imunocombinados da modalidade 21 ou 22 em que a relação de anticorpo de fármaco é de cerca de 8.

24. O imunocombinado de acordo com quaisquer das modalidades 1-23 também compreendendo uma porção de fármaco.

25. O imunocombinado da modalidade 24, em que uma porção de fármaco é ligada ao anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo através de enxofre da referida cisteína e um ligante opcional.

26. O imunocombinado da modalidade 25, em que a referida porção de fármaco é conectada ao referido enxofre da referida cisteína através de um ligante de clivagem ou não clivagem.

27. O imunocombinado da modalidade 25, em que a referida porção de fármaco é conectada ao referido enxofre da referida cisteína através de um ligante de não clivagem.

28. O imunocombinado da modalidade 25, em que o referido imunocombinado compreende uma ligação de tiol-maleimida.

29. O imunocombinado da modalidade 25, em que o referido imunocombinado compreende uma ligação $-S-CH_2-C(=O)-$ ou uma ligação de dissulfeto.

30. O imunocombinado de acordo com quaisquer modalidades 25-29, em que a referida porção de fármaco é um agente citotóxico.

31. O imunocombinado da modalidade 30, em que a referida porção de fármaco é selecionada do grupo consistindo em taxanos, agentes de alquilação de DNA (por exemplo, análogos de CC-1065),

antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, e maitansinoides.

32. O imunocjugado de acordo com quaisquer das modalidades 1-31, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

33. O imunocjugado de acordo com quaisquer das modalidades 1-31, em que o referido anticorpo é um anticorpo quimérico.

34. O imunocjugado da modalidade 31, em que o referido anticorpo é um anticorpo humanizado ou completamente humano.

35. O imunocjugado da modalidade 31, em que o referido anticorpo é um anticorpo biespecífico ou multiespecífico.

36. O imunocjugado de acordo com quaisquer das modalidades 1-32, em que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo especificamente liga-se a um marcador de superfície de célula característico de um tumor.

37. Uma composição farmacêutica compreendendo o imunocjugado de acordo com quaisquer das modalidades 1-36.

38. Um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada das posições 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400, e 422 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

39. Um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada das posições 107,

108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, e 203 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana.

40. Um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante selecionada das posições 143, 145, 147, 156, 159, 163, 168 em sua região constante de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve lambda humana.

41. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 38, em que a referida substituição é pelo menos uma cisteína, selecionada das posições 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360, e 375 da cadeia pesada, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

42. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 39, em que referida substituição é de duas a seis cisteínas, em que as referidas cisteínas estão nas posições selecionadas de 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360, e 375 de uma cadeia pesada, e em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

43. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 39, em que referida substituição é pelo menos uma cisteína, selecionada das posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

44. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da

modalidade 40, em que referida substituição é de duas a seis cisteínas, em que as referidas cisteínas estão nas posições selecionadas das posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU, e em que a referida cadeia leve é a cadeia leve capa humana.

45. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 40, em que referida substituição é pelo menos uma cisteína, selecionada das posições 143, 147, 159, 163, e 168 de uma cadeia leve, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana.

46. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 40, em que referida substituição é de duas a seis cisteínas, em que as referidas cisteínas estão nas posições selecionadas das posições 143, 147, 159, 163, e 168 de uma cadeia leve, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é uma cadeia leve lambda humana.

47. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com quaisquer das modalidades 11, 12, 14-22, 38-47 o qual é também ligado a uma porção de fármaco, e em que a referida porção de fármaco é ligada ao anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo através de um enxofre da referida cisteína e um ligante opcional.

48. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo da modalidade 47, em que a referida porção de fármaco é ligada ao enxofre da referida cisteína através de uma unidade ligante.

49. O anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com quaisquer uma das modalidades 38-48, também

compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido artificial ou Pcl ou um rótulo de peptídeo para a conjugação mediada por enzima e/ou combinações desta.

50. Um ácido nucleico codificando o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com quaisquer uma das modalidades 38-49.

51. Uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico da modalidade 50.

52. Um método de produzir um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreendendo incubar a célula hospedeira da modalidade 49 sob condições adequadas para expressar o anticorpo ou fragmento de anticorpo, e isolar o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo.

53. Um método para selecionar um aminoácido de um anticorpo que seja adequada para substituição por cisteína para fornecer um sítio adequado para a conjugação, compreendendo

(1) identificar os aminoácidos na região constante do anticorpo que possuem uma exposição de superfície adequada para fornecer um grupo de sítios candidatos iniciais;

(2) para cada sítio candidato inicial, expressar um anticorpo em que o aminoácido nativo naquele sítio seja substituído por cisteína;

(3) para cada anticorpo expresso, determinar se a proteína expressa está substancialmente homogênea após a redução e reoxidação para fornecer um anticorpo funcional tendo uma cisteína livre no sítio candidato inicial,

(4) para cada proteína expressa que seja substancialmente homogênea e funcional, conjugar a cisteína no sítio candidato inicial com uma porção de maleimida e determinar se a ligação de tiol-maleimida está desestabilizada naquele sítio;

(5) remover do grupo de sítios candidatos iniciais aqueles

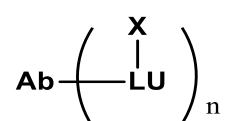
sítios para os quais o anticorpo expresso não seja substancialmente homogêneo e funcional, e aqueles em que a ligação de tiol-maleimida esteja desestabilizada, para fornecer um grupo de sítios vantajosos para a substituição de cisteína.

54. O método da modalidade 53, também compreendendo uma etapa de determinar a temperatura de fusão para o conjugado de cada sítio de substituição de cisteína vantajoso, e eliminar do grupo quaisquer sítios onde a conjugação e substituição de cisteína motiva a temperatura de fusão para diferir de 5°C ou mais daquela do anticorpo parental.

55. O método da modalidade 53 ou 54, também compreendendo produzir um anticorpo ou fragmento de anticorpo contendo cisteína em um ou mais dos sítios de substituição identificados.

56. Um método para produzir um imunocombinado, o qual compreende ligar uma unidade ligante (LU) ou uma combinação de carga útil da unidade ligante (-LU-X) a um resíduo de cisteína em um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que a cisteína esteja localizada em um sítio de substituição de cisteína selecionado de 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360, e 375 de uma cadeia pesada do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, e posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 de uma cadeia leve do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

57. O método da modalidade 56, em que o imunocombinado seja de fórmula (I):



em que Ab representa um anticorpo ou fragmento de anticorpo

compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína em um dos sítios de substituição preferidos de cisteína descritos aqui;

[0033] LU é uma Unidade Ligante como descrito aqui;

[0034] X é uma carga útil ou porção de fármaco;

[0035] e n é um número inteiro de 1 a 16.

Definições

[0036] O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos canonicais, sintéticos e artificiais, bem como análogos de aminoácido e miméticos de aminoácido que funcionam de uma maneira similar aos aminoácidos canonicais. Os aminoácidos canonicais são aminoácidos proteinogênicos codificados pelo código genético e incluem alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina serina, treonina, triptofan, tirosina, valina, bem como selenocisteína, pirrolisina e seu análogo pirrolina-carbóxi-lisina. Os análogos de aminoácido referem-se aos compostos que possuem a mesma estrutura química básica como um aminoácido canônico, isto é, um α -carbono que seja ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino, e um grupo R, por exemplo, citrulina, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Tais análogos possuem grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou cadeias principais de peptídeo modificado, porém retêm a mesma estrutura química básica como um aminoácido canônico.

[0037] Os miméticos de aminoácido referem-se aos compostos químicos que possuem uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, porém aquela funciona de uma maneira similar a um aminoácido canônico. O termo "aminoácido artificial", como empregado aqui, é pretendido representar estruturas de aminoácido que não podem ser geradas biossinteticamente em qualquer organismo empregando-se genes não modificados ou

modificados de qualquer organismo, iguais ou diferentes. Além disso, tais "aminoácidos artificiais" tipicamente requerem um tRNA modificado e uma sintetase de tRNA modificado (RS) para incorporação em uma proteína. Este par de tRNA/RS preferencialmente incorpora o aminoácido artificial sobre os aminoácidos canonicais. Tal par de tRNA/RS ortogonal é gerado por um processo de seleção como desenvolvido por Schultz e outro(s) (ver, por exemplo, Liu e outro(s), (2010) *Annu. Rev. Biochem.* 79:413-444) ou um procedimento similar. O termo "aminoácido artificial" não inclui 22^a pirrolisina de aminoácido proteínogênico de ocorrência natural (Pyl) bem como seu análogo desmetilado pirrolina-carbóxi-lisina (Pcl), por causa da incorporação de ambos resíduos nas proteínas ser mediada pelo par de sintetase de pirrolisil-tRNA/tRNA de ocorrência natural não modificado e porque Pyl e Pcl são gerados biossinteticamente (ver, por exemplo, Ou e outro(s), (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:10437-10442; Cellitti e outro(s), (2011) *Nat. Chem. Biol.* 27;7(8):528-30). Ver também Pedido provisório dos Estados Unidos 61/76236, incorporado por referência, os quais resíduos de aminoácido específico de sítios em cadeias pesadas e leves de anticorpo que podem ser substituídas com Pcl.

[0038] O termo "anticorpo", como empregado aqui, refere-se a um polipeptídeo da família de imunoglobulina que é capaz de ligar-se a um antígeno correspondente não covalentemente, reversível, e de uma maneira específica. Por exemplo, um anticorpo de IgG de ocorrência natural é um tetrâmero compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) (também referidas como "cadeia pesada de anticorpo") e duas cadeias leves (L) (também referidas como "cadeia leve de anticorpo") interconectadas pelas ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é composta de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A

região constante de cadeia pesada é composta de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é composta de um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser também subdivididas em regiões de hiper variabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs arranjados de terminais amino a terminais carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, e FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos fatores ou tecidos hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico.

[0039] O termo “anticorpo” inclui, porém não é limitado a, anticorpos monoclonais, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos camelid, anticorpos quiméricos, e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id a anticorpos da invenção). Os anticorpos podem ser de qualquer isotipo/classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

[0040] Ambas as cadeias leves e pesadas são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos “constante” e “variável” são empregados funcionalmente. A respeito disso, será apreciado que os domínios variáveis de ambas as porções de cadeia leve (V_L) e pesada (V_H) determinam a especificidade e reconhecimento de antígeno. Ao contrário, os domínios constantes da cadeia leve (C_L) e a cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades

biológicas importantes tais como secreção, mobilidade transplacental, ligação de receptor de Fc, ligação de complemento, e similar(es). Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta quando eles tornam-se mais distantes do sítio de ligação de antígeno ou terminal amino do anticorpo. O terminal-N é uma região variável e no terminal-C é uma região constante; os domínios CH3 e C_L de fato compreendem os domínios de terminal carbóxi da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[0041] O termo “fragmento de anticorpo”, como empregado aqui, refere-se a um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo ou um fragmento de ligação de não antígeno (por exemplo, Fc) de um anticorpo. O termo “fragmento de ligação de antígeno”, como empregado aqui, refere-se a uma ou mais porções de um anticorpo que retém a capacidade de especificamente interagir com (por exemplo, por ligação, impedimento estérico, estabilização/desestabilização, distribuição espacial) um epitopo de um antígeno. Exemplos de fragmentos de ligação incluem, porém não são limitados a, Fvs de cadeia única (scFv), Fvs ligado por dissulfeto (sdFv), fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), um fragmento monovalente consistindo em domínios de V_L, V_H, C_L e CH1; um fragmento de F(ab)₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos de Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região da dobradiça; um fragmento de Fd consistindo nos domínios V_H e CH1; um fragmento de Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de uma ramificação única de um anticorpo; um fragmento de dAb (Ward e outro(s), Nature 341:544-546, 1989), o qual consiste em um domínio de V_H; e uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR), ou outros fragmentos de ligação de epitopo de um anticorpo.

[0042] Além disso, embora os dois domínios do fragmento de Fv, V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, eles podem ser

ligados empregando-se métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite-os serem feitos como uma cadeia de proteína única na qual o par de regiões V_L e V_H forma moléculas monovalentes (conhecidos como cadeia única Fv (“scFv”); ver, por exemplo, Bird e outro(s), *Science* 242:423-426, 1988; e Huston e outro(s), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883, 1988). Tais anticorpos de cadeia única são também pretendidos serem abrangidos dentro do termo “fragmento de ligação de antígeno.” Estes fragmentos de ligação de antígeno são obtidos empregando-se técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto a utilidade da mesma maneira como são os anticorpos intactos.

[0043] Os fragmentos de ligação de antígeno podem também ser incorporados em anticorpos de domínio único, maxicorpos, minicorpos, nanocorpos, intracorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, v-NAR e bis-scFv (ver, por exemplo, Hollinger e Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Os fragmentos de ligação de antígeno podem ser enxertados em andaimes com base nos polipeptídeos tal como fibronectina tipo III (Fn3) (ver Patente dos Estados Unidos N° 6.703.199, que descreve os monocorpos de polipeptídeo de fibronectina).

[0044] Os fragmentos de ligação de antígeno podem ser incorporados em moléculas de cadeia única compreendendo um par de fragmentos Fv tandem (V_H -CH1- V_H -CH1) os quais, juntos com polipeptídeos de cadeia leve complementar, formam um par de regiões de ligação de antígeno (Zapata e outro(s), *Protein Eng.* 8:1057-1062, 1995; e Patente dos Estados Unidos N° 5.641.870).

[0045] O termo “anticorpo monoclonal” ou “composição de anticorpo monoclonal”, como empregado aqui, refere-se a polipeptídeos, incluindo anticorpos e fragmento de anticorpo que possuem sequência de aminoácido substancialmente idêntica ou são

derivados da mesma fonte genética. Este termo também inclui preparações de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma afinidade e especificidade de ligação única para um epitopo particular.

[0046] O termo “anticorpo humano”, como empregado aqui, inclui anticorpos tendo regiões variáveis nas quais ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas de sequências de origem humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de tais sequências humanas, por exemplo, sequências de linha germinal humana, ou versões mutadas de sequências de linha germinal humana ou anticorpo contendo sequências de estrutura de consenso derivadas da análise de sequências de estrutura humana, por exemplo, como descrito em Knappik e outro(s), *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000).

[0047] Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências humanas (por exemplo, mutações introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*, ou uma substituição conservativa para promover a estabilidade ou a fabricação).

[0048] O termo anticorpo “humanizado”, como empregado aqui, refere-se a um anticorpo que retém a reatividade de um anticorpo não humano ao mesmo tempo que sendo menos imunogênico em humanos. Isto pode ser obtido, por exemplo, retendo-se as regiões CDR não humanas e substituindo-se as partes remanescentes do anticorpo com suas contrapartes humanas. Ver, por exemplo, Morrison e outro(s), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen e outro(s), *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

[0049] O termo “reconhecer”, como empregado aqui, refere-se a

um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno dos mesmos que encontram e interagem (por exemplo, ligam-se) com seu epítopo, seja aquele epítopo linear ou conformacional. O termo “epítopo” refere-se a um sítio sobre um antígeno ao qual um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno da invenção especificamente liga-se. Os epítopos podem ser formados igualmente de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos pela duplicação terciária de uma proteína. Os epítopos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos em exposição a solventes de desnaturação, visto que os epítopos formados por duplicação terciária estão tipicamente perdidos no tratamento com solventes de desnaturação. Um epítopo tipicamente inclui pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Os métodos de determinar a conformação espacial de epítopos incluem técnicas na arte, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear 2-dimensional (ver, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0050] O termo “afinidade” como empregado aqui, refere-se a força de interação entre o anticorpo e o antígeno em sítios antigênicos únicos. Dentro de cada sítio antigênico, a região variável da “ramificação” de anticorpo interage através de forças não covalentes fracas com o antígeno em numerosos sítios; quanto mais interações, maior a afinidade.

[0051] O termo “anticorpo isolado” refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades de antigênicas diferentes. Um anticorpo isolado que especificamente liga-se a um antígeno pode, portanto, ter reatividade cruzada a outros antígenos. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outras químicas e/ou material celular.

[0052] O termo “variante conservadoramente modificada” aplica-se

a ambas as sequências de aminoácido e ácido nucleico. Com relação às sequências de ácido nucleico particular, as variantes conservadoramente modificadas referem-se àqueles ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácido idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácido, para sequências essencialmente idênticas. Por causa da degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica qualquer proteína fornecida. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU todos codificam a alanina de aminoácido. Desse modo, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para quaisquer dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácido nucleico são “variações silenciosas,” que são uma espécie de variações conservadoramente modificadas. Cada sequência de ácido nucleico que codifica aqui um polipeptídeo também descreve cada possível variação silenciosa do ácido nucleico. Alguém experiente reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que é ordinariamente apenas o códon para metionina, e TGG, o qual é ordinariamente apenas o códon para triptofan) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Conseqüentemente, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo está implícita em cada sequência descrita.

[0053] Para as sequências de polipeptídeo, as “variantes conservadoramente modificadas” incluem substituições individuais, deleções ou adições a uma sequência de polipeptídeo que resulta na substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente similar. As tabelas de substituição conservadoras fornecendo aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica.

Tais variantes conservadoramente modificadas são, além disso, e não excluem variantes polimórficas, homólogos de interespécie, e alelos da invenção. Os oito grupos seguintes contêm os aminoácidos que são substituições conservadoras um para o outro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofan (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por exemplo, Creighton, Proteins (1984)). Em algumas modalidades, o termo "modificações de sequência conservadora" é empregado para referir-se às modificações de aminoácido que não significativamente afetam ou alteram as características de ligação do anticorpo contendo a sequência de aminoácido.

[0054] O termo "otimizado", como empregado aqui, refere-se a uma sequência de nucleotídeo foi alterado para codificar uma sequência de aminoácido empregando-se códons que são preferidos no organismo ou célula de produção, geralmente uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de levedura, uma célula *Pichia*, uma célula fúngica, uma célula *Trichoderma*, uma célula de ovário de *Hamster* chinês (CHO) ou uma célula humana. A sequência de nucleotídeo otimizado é planejada para reter completamente ou tanto quanto possível a sequência de aminoácido originalmente codificada pela sequência de nucleotídeo de partida a qual é também conhecida como a sequência "parental".

[0055] Os termos "porcentagem idêntica" ou "identidade de porcentagem," no contexto de duas ou mais sequências de polipeptídeo ou ácidos nucleicos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais. Duas sequências são "substancialmente idênticas" se as duas sequências possuem uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos

que sejam iguais (isto é, 60% de identidade, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99% de identidade sobre uma região especificada, ou, quando não especificada, sobre a sequência inteira), quando comparadas e alinhadas para a máxima correspondência sobre uma janela de comparação, ou região designada como medido empregando-se um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência ou pelo alinhamento manual e inspeção visual. Opcionalmente, a identidade existe sobre uma região que seja pelo menos cerca de 30 nucleotídeos (ou 10 aminoácidos) de comprimento, ou mais preferivelmente sobre uma região que seja de 100 a 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos (ou 20, 50, 200 ou mais aminoácidos) de comprimento.

[0056] Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência age como uma sequência de referência, à qual as sequências teste são comparadas. Quando empregando-se um algoritmo de comparação de sequência, as sequências teste e de referência são registradas em um computador, as coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. Os parâmetros do programa básicos podem ser empregados, ou os parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequência em seguida calcula a porcentagem das identidades de sequência para a sequência teste com relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa.

[0057] Uma “janela de comparação”, como empregado aqui, inclui a referência a um segmento de qualquer um dos números de posições contíguas selecionados do grupo consistindo em de 20 a 600, normalmente de cerca de 50 a cerca de 200, mais usualmente cerca de 100 a cerca de 150 em que a sequência pode ser comparada a uma sequência de referência do mesmo número de posições

contíguas após as duas sequências serem otimamente alinhadas. Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela pesquisa para o método de similaridade de Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), pelas implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou pelo alinhamento manual e inspeção visual (ver, por exemplo, Brent e outro(s), *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

[0058] Dois exemplos que são adequados para determinar a porcentagem da identidade de sequência e a similaridade sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, os quais são descritos em Altschul e outro(s), *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; e Altschul e outro(s), *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, respectivamente. O *Software* para realizar a análise de BLAST está publicamente disponível através do Centro Nacional para Informação de Biotecnologia. Este algoritmo envolve primeiro identificar os pares de sequência de classificação elevada (HSPs) identificando-se as palavras pequenas de comprimento W na sequência dúvida, a qual emparelha ou satisfaz algum escore T de entrada de valor positivo quando alinhada com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência do banco de dados. T é referido como o escore de entrada da palavra vizinha (Altschul e outro(s), *supra*). Estes *hits* de palavras vizinhas iniciais agem como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs maiores contendo-as. Os *hits* de palavra são estendidos em ambas as

direções ao longo de cada sequência tão longe quanto o escore de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados empregando-se, para as sequências de nucleotídeo, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre > 0) e N (escore de penalidade para resíduos de má combinação; sempre < 0). Para as sequências de aminoácido, uma matriz de classificação é empregada para calcular o escore cumulativo. A extensão dos *hits* da palavra em cada direção é interrompida quando: o escore de alinhamento cumulativo cai pela quantidade de X de seu valor máximo alcançado; o escore cumulativo vai a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de classificação negativa; ou o fim da sequência é alcançado. Os parâmetros W, T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeo) usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) ou 10, M=5, N=-4 e uma comparação de ambos os filamentos. Para as sequências de aminoácido, o programa BLASTP usa como padrão um comprimento de palavra de 3, e expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação de BLOSUM62 (ver Henikoff e Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos os filamentos.

[0059] O algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Uma medida da similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade de menor soma ($P(N)$), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma comparação entre duas sequências de aminoácido ou nucleotídeo ocorreria por mudança. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a uma sequência referência se a

probabilidade de menor soma em uma comparação do ácido nucleico teste ao ácido nucleico de referência for menor do que cerca de 0,2, mais preferivelmente menor do que cerca de 0,01, e mais preferivelmente menor do que cerca de 0,001.

[0060] A porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácido pode também ser determinada empregando-se o algoritmo de E. Meyers e W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17, 1988) o qual foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), empregando-se uma tabela de resíduo de valor PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre as duas sequências de aminoácido pode ser determinada empregando-se o algoritmo Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970) o qual foi incorporado no programa GAP no pacote de *software* GCG (disponível em www.gcg.com), empregando-se uma matriz Blossom 62 ou uma matriz PAM250, e um valor de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um valor de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

[0061] Diferente da porcentagem da identidade da sequência acima estabelecido, outra indicação que duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico é reativo imunologicamente cruzado com os anticorpos aumentados contra o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, como abaixo descrito. Desse modo, um polipeptídeo é tipicamente substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem apenas por substituições conservadoras. Outra indicação de que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas ou seus complementos hibridizam uma a outra sob condições rigorosas, como abaixo descrito. Ainda outra indicação de que duas sequências

de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que os mesmos iniciadores podem ser empregados para amplificar a sequência.

[0062] O termo “ácido nucleico” é empregado aqui alternadamente com o termo “polinucleotídeo” e refere-se a desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros dos mesmos na forma de filamento único ou duplo. O termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos de nucleotídeo conhecidos ou ligações ou resíduos de cadeia principal modificados, os quais são sintéticos, de ocorrência natural, e de ocorrência não natural, que possuem propriedades de ligação similares como o ácido nucleico de referência, e que são metabolizados de uma maneira similar aos nucleotídeos de referência. Exemplos de tais análogos incluem, sem limitação, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metila, fosfonatos de quiral-metila, ribonucleotídeos de 2-O-metila, ácidos peptídeo-nucleicos (PNAs).

[0063] A não ser que de outra forma indicado, uma sequência de ácido nucleico particular também implicitamente abrange variantes silenciosas dos mesmos (por exemplo, substituições de códon degenerado) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, como abaixo detalhado, as substituições de códon degenerado podem ser obtidas gerando-se sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com resíduos de desoxinosina e/ou base misturados (Batzner e outro(s), (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka e outro(s), (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; e Rossolini e outro(s), (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

[0064] O termo “operacionalmente ligado” no contexto de ácidos nucleicos refere-se a uma relação funcional entre dois ou mais segmentos de polinucleotídeo (por exemplo, DNA). Tipicamente, ele refere-se à relação funcional de uma sequência reguladora transcricional a uma sequência transcrita. Por exemplo, uma

sequência realçadora ou promotora é operacionalmente ligada a uma sequência de codificação se ela estimula ou modula a transcrição da sequência de codificação em uma célula hospedeira apropriada ou outro sistema de expressão. Geralmente, as sequências reguladoras transcricionais promotoras que são operacionalmente ligadas a uma sequência transcrita são fisicamente contíguas à sequência transcrita, isto é, elas são cis-execução. Entretanto, algumas sequências reguladoras transcricionais, tais como realçadoras, não necessitam ser fisicamente contíguas ou localizadas em estreita proximidade às sequências de codificação cuja transcrição elas realçam.

[0065] Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são empregados alternadamente aqui para referirem-se a um polímero de resíduos de aminoácido. Os termos aplicam-se aos polímeros de aminoácido canonical bem como aos polímeros de aminoácido não canonical. A não ser que de outra forma indicado, uma sequência de polipeptídeo particular também implicitamente abrange variantes conservadoramente modificadas deste.

[0066] O termo "imunoconjugado" ou “conjugado de anticorpo” como empregado aqui refere-se à ligação de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo com outro agente, tal como um agente quimioterapêutico, uma toxina, um agente imunoterapêutico, uma sonda de imagem, uma sonda espectroscópica, e similar(es). A ligação pode ser através de uma ou múltiplas ligações covalentes, ou interações não covalentes, e podem incluir a quelação. Vários ligantes, muitos dos quais são conhecidos na técnica, podem ser empregados a fim de formar o imunoconjugado. Adicionalmente, o imunoconjugado pode ser fornecido na forma de uma proteína de fusão que pode ser expressa de um polinucleotídeo codificando o imunoconjugado. Como empregado aqui, “proteína de fusão” refere-se às proteínas criadas através da junção de dois ou mais genes ou fragmentos de gene os

quais originalmente codificados para separar proteínas (incluindo peptídeos e polipeptídeos). As proteínas de fusão podem ser criadas juntando-se no terminal N ou C, ou por inserções de genes ou fragmentos de gene em regiões permissíveis de uma das proteínas parceiras. A translação do gene de fusão resulta em uma proteína única com propriedades funcionais derivadas de cada uma das proteínas originais.

[0067] O termo “indivíduo” inclui animais humanos e não humanos. Os animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelha, cachorro, vaca, galinhas, anfíbios, e répteis. Exceto quando conhecido, os termos “paciente” ou “indivíduo” são empregados aqui alternadamente.

[0068] O termo “citotoxina”, ou “agente citotóxico” como empregado aqui, refere-se a qualquer agente que seja prejudicial ao crescimento e a proliferação de células e pode agir para reduzir, inibir ou destruir uma célula ou malignidade.

[0069] O termo “agente anticâncer” como empregado aqui, refere-se a qualquer agente que possa ser empregado para tratar um distúrbio de proliferação de célula tal como câncer, incluindo, porém não limitado a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, radioterapia e agentes radioterapêuticos, agentes anticâncer alvejados e agentes imunoterapêuticos.

[0070] Os termos “porção de fármaco” ou “carga útil” são empregados alternadamente e referem-se a uma porção química que é conjugada ao anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção, e podem incluir qualquer porção que seja útil para ligar-se a um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Por exemplo, a porção de fármaco ou carga útil pode ser um agente anticâncer, um agente anti-inflamatório, um agente antifúngico, um agente antibacteriano, um

agente antiparasítico, um agente antiviral, um agente anestético. Em certas modalidades a porção de fármaco é selecionada de um inibidor de V-ATPase, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizador de microtúbulo, destabilizadores de microtúbulo, uma auristatina, uma dolastatina, um maitansinoide, um MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, um inibidor de reações de transferência de fosforila em mitocôndria, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de cinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de proteasoma, um inibidor de cinesina, um inibidor de HDAC, um agente de danificação de DNA, um agente de alquilação de DNA, um intercalador de DNA, um ligante de sulco menor de DNA e um inibidor de DHFR. Exemplos adequados incluem auristatinas tais como MMAE e MMAF; caliqueamicinas tal como gama-caliqueamicina; e maitansinoides tais como DM1 e DM4. Os métodos para ligar cada um destes a um ligante compatível com os anticorpos e método da invenção são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Singh e outro(s), (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Além disso, uma carga útil pode ser uma sonda biofísica, um fluoróforo, um rótulo giratório, uma sonda de infravermelho, uma sonda de afinidade, um quelante, uma sonda espectroscópica, uma sonda radioativa, uma molécula de lipídeo, um polietileno glicol, um polímero, um rótulo giratório, DNA, RNA, uma proteína, um peptídeo, uma superfície, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma nanopartícula, um ponto quântico, um lipossoma, uma partícula de PLGA, um sacarídeo ou um polissacarídeo, um grupo funcional reativo, ou um agente de ligação que possa conectar o conjugado a outra porção, superfície, etc.

[0071] O termo “relação de anticorpo de fármaco” (também referido como “DAR”), refere-se ao número ou carga útil ou porções de

fármaco ligados a um anticorpo do imunoconjugado. Por exemplo, um anticorpo de fármaco de relação 2 significa que na média duas porções de fármaco ligadas a cada um anticorpo em uma amostra de imunoconjugados. Alguns imunoconjugados individuais estarão em uma amostra com uma relação de anticorpo fármaco das duas pode ter nenhuma ou apenas uma porção de fármaco ligada; outros imunoconjugados naquela amostra terá duas, três, quatro ou ainda mais porções sobre o anticorpo individual. Porém, a média na amostra será de duas. Existem diferentes métodos conhecidos na técnica para medir as relações de anticorpo de fármaco de imunoconjugados.

[0072] Em uma modalidade desta invenção, o DAR em uma amostra de imunoconjugados pode ser “homogêneo”. Uma “amostra de conjugação homogênea” é uma amostra com uma distribuição limitada de DAR. Como uma modalidade ilustrativa, em uma amostra de conjugação homogênea tendo um DAR de 2, pode conter dentro daquela amostra anticorpos que não são conjugados, e alguns anticorpos tendo mais do que duas porções conjugadas em cerca de um DAR de dois. “Maioria da amostra” significa ter pelo menos mais de 70%, ou pelo menos mais de 80% ou pelo menos mais de 90% dos anticorpos na amostra será conjugado para duas porções.

[0073] Como uma modalidade ilustrativa, em uma amostra de conjugação homogênea tendo um DAR de 4, pode conter dentro daquela amostra anticorpos que possuem mais ou menos do que quatro porções conjugadas a cerca de um DAR de quatro. “Maioria da amostra” significa ter pelo menos mais de 70%, ou pelo menos mais de 80% ou pelo menos mais de 90% dos anticorpos na amostra será conjugado para quatro porções.

[0074] Como uma modalidade ilustrativa, em uma amostra de conjugação homogênea tendo um DAR de 6, pode conter dentro da amostra anticorpos que terão mais ou menos do que seis porções

conjugadas a cerca de um DAR de seis. “Maioria da amostra” significa ter pelo menos mais de 70%, ou pelo menos mais de 80% ou pelo menos mais de 90% dos anticorpos na amostra será conjugado para seis porções.

[0075] Como uma modalidade ilustrativa, em uma amostra de conjugação homogênea tendo um DAR de 8, pode conter dentro daquela amostra anticorpos que possuem alguns anticorpos tendo menos ou mais do que oito porções conjugadas a cerca de um DAR de quatro. “Maioria da amostra” significa ter pelo menos mais de 70%, ou pelo menos mais de 80% ou pelo menos mais de 90% dos anticorpos na amostra será conjugado para oito porções.

[0076] Um imunoconjugado tendo uma “relação de anticorpo de fármaco de cerca de 2” refere-se à amostra de imunoconjugados em que em uma relação de anticorpo de fármaco pode variar de cerca de 1,6-2,4 porções/anticorpo, 1,8-2,3 porções/anticorpo, ou 1,9-2,1 porções/anticorpo.

[0077] Um imunoconjugado tendo uma “relação de anticorpo de fármaco de cerca de 4” refere-se à amostra de imunoconjugados em que em uma relação de anticorpo de fármaco pode variar de cerca de 3,6-4,4 porções/anticorpo, 3,8-4,3 porções/anticorpo, ou 3,9-4,1 porções/anticorpo.

[0078] Um imunoconjugado tendo uma “relação de anticorpo de fármaco de cerca de 6” refere-se à amostra de imunoconjugados em que em uma relação de anticorpo de fármaco pode variar de cerca de 5,6-6,4 porções/anticorpo, 5,8-6,3 porções/anticorpo, ou 5,9-6,1 porções/anticorpo.

[0079] Um imunoconjugado tendo uma “relação de anticorpo de fármaco de cerca de 8” refere-se à amostra de imunoconjugados em que em uma relação de anticorpo de fármaco pode variar de cerca de 7,6-8,4 porções/anticorpo, 7,8-8,3 porções/anticorpo, ou 7,9-8,1

porções/anticorpo.

[0080] “Tumor” refere-se à proliferação e ao crescimento de célula neoplástica, seja maligno ou benigno, e todos os tecidos e células pré-cancerosos e cancerosos.

[0081] O termo “atividade antitumor” significa uma redução na taxa de proliferação de célula de tumor, viabilidade ou atividade metastática. Uma possível forma de exibir a atividade antitumor é mostrar um declínio na taxa de crescimento de células anormais que surgem durante a terapia ou redução ou estabilidade do tamanho do tumor. Tal atividade pode ser avaliada empregando-se os modelos de tumor aceitos *in vitro* ou *in vivo*, incluindo, porém não limitado a, modelos de xenoenxerto, modelos de aloenxerto, modelos de MMTV, e outros modelos sabidos conhecidos na técnica para investigar a atividade antitumor.

[0082] O termo “malignidade” refere-se a um tumor não benigno ou um câncer. Como empregado aqui, o termo “câncer” inclui uma malignidade caracterizada pelo crescimento celular desregulado ou descontrolado. Exemplos de cânceres incluem: carcinomas, sarcomas, leucemias, e linfomas.

[0083] O termo “câncer” inclui tumores malignos primários (por exemplo, aqueles cujas células não foram migradas a sítios no corpo do indivíduo diferente do sítio do tumor original) e tumores malignos secundários (por exemplo, aqueles surgindo de metástase, a migração de células de tumor aos sítios secundários que são diferentes do sítio do tumor original).

[0084] Como empregado aqui, o termo “um isômero óptico” ou “um estereoisômero” refere-se a quaisquer das várias configurações estereo isoméricas que podem existir para um composto fornecido da presente invenção e inclui isômeros geométricos. É entendido que um substituinte pode ser ligado em um centro quiral de um átomo de

carbono. O termo "quiral" refere-se a moléculas que possuem a propriedade de não sobreponibilidade sobre seu parceiro de imagem refletida, enquanto o termo "aquiral" refere-se às moléculas que são sobreponíveis sobre seu parceiro de imagem refletida. Portanto, a invenção inclui enantiômeros, diaestereômeros ou racematos do composto. "Enantiômeros" são um par de estereoisômeros que são imagens refletidas não sobreponíveis um do outro. Uma mistura 1:1 de um par de enantiômeros é uma mistura "racêmica". O termo é empregado para designar uma mistura racêmica onde apropriado. "Diaestereoisômeros" são estereoisômeros que possuem pelo menos dois átomos assimétricos, porém, que não são imagens refletidas um do outro. A estereoquímica absoluta é especificada de acordo com o sistema Cahn-Ingold-Prelog R-S. Quando um composto é um enantiômero puro, a estereoquímica em cada carbono quiral pode ser especificada por *R* ou *S*. Os compostos resolvidos cuja configuração absoluta é desconhecida podem ser designados (+) ou (-) dependendo da direção (dextro- ou levogiratório) que eles giram no plano de luz polarizada no comprimento de onda da linha D de sódio. Certos compostos descritos aqui contêm um ou mais eixos ou centros assimétricos e podem, desse modo, dar origem aos enantiômeros, diaestereômeros, e outras formas estereoisoméricas que podem ser definidas em termos de estereoquímica absoluta, como (*R*)- ou (*S*)-.

[0085] Dependendo da escolha dos procedimentos e materiais de partida, os compostos podem estar presentes na forma de um dos possíveis isômeros ou como misturas destes, por exemplo, como isômeros ópticos puros, ou como misturas de isômeros, tais como misturas de racematos e diaestereoisômero, dependendo do número de átomos de carbono assimétricos. A presente invenção é pretendida incluir todos tais possíveis isômeros, incluindo misturas racêmicas, misturas diaesterioméricas e formas opticamente puras. Os

opticamente ativos isômeros (*R*) e (*S*) podem ser preparados empregando-se sintons quirais ou reagentes quirais, ou podem ser resolvidos empregando-se técnicas convencionais. Se o composto contém uma ligação dupla, o substituinte pode ter a configuração E ou Z. Se o composto contém uma cicloalquila dissubstituída, o substituinte de cicloalquila pode ter uma configuração cis ou trans. Todas as formas tautoméricas são também pretendidas estarem inclusas.

[0086] Como empregado aqui, os termos “sal” ou “sais” referem-se a um sal de adição de ácido ou adição de base de um composto da invenção. Os “Sais” incluem em particular “sais farmacêuticos aceitáveis”. O termo “sais farmacêuticamente aceitáveis” refere-se a sais que retêm a eficácia biológica e as propriedades dos compostos desta invenção e, os quais tipicamente não são biologicamente ou de outra forma desejáveis. Em muitos casos, os compostos da presente invenção são capazes de formar sais de ácido e/ou base em virtude da presença de grupos amino e/ou carboxila ou grupos similares a eles.

[0087] Os sais de adição de ácido farmacêuticamente aceitáveis podem ser formados com ácidos inorgânicos e orgânicos, por exemplo, sais de acetato, aspartato, benzoato, besilato, brometo/hidrobrometo, bicarbonato/carbonato, bissulfato/sulfato, canforsulfonato, cloreto/cloridrato, cloroteofilinato, citrato, etandissulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidriodeto/iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrogênio/fosfato de diidrogênio, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartarato, tosilato e trifluoroacetato.

[0088] Os ácidos inorgânicos dos quais os sais podem ser

derivados incluem, por exemplo, ácido hidrolórico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e similar(es).

[0089] Os ácidos orgânicos dos quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malônico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido toluenossulfônico, ácido sulfosalicílico e similar(es). Os sais de adição de base farmacologicamente aceitáveis podem ser formados com bases inorgânicas e orgânicas.

[0090] As bases inorgânicas das quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, metais e sais de amônio das colunas I a XII da tabela periódica. Em certas modalidades, os sais são derivados de sais de sódio, potássio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, prata, zinco e cobre; os sais particularmente adequados incluem sais de amônio, potássio, sódio, cálcio e magnésio.

[0091] As bases orgânicas das quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, amins primárias, secundárias e terciárias, amins substituídas incluindo amins substituídas de ocorrência natural, amins cíclicas, resinas de permuta de íon básicas e similar(es). Certas amins orgânicas incluem isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina e trometamina.

[0092] Os sais farmacologicamente aceitáveis da presente invenção podem ser sintetizados de uma porção ácida ou básica por métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais podem ser preparados reagindo-se as formas de ácido livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base apropriada (tal como hidróxido de Na, Ca, Mg, ou K, carbonato, bicarbonato ou similar(es)), ou reagindo-

se as formas de base livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica do ácido apropriado. Tais reações são tipicamente realizadas em água ou em um solvente orgânico, ou em uma mistura dos dois. Geralmente, o uso de meios não aquosos tipo éter, acetato de etila, etanol, isopropanol, ou acetonitrila é desejável, onde praticável. As listas de sais adequados adicionais podem ser encontradas, por exemplo, em “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); e em “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” por Stahl e Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 2002).

[0093] Qualquer fórmula fornecida aqui é também pretendida representar formas não rotuladas bem como formas isotopicamente rotuladas dos compostos. Os compostos isotopicamente rotulados possuem estruturas descritas pelas fórmulas fornecidas aqui, exceto que um ou mais átomos são substituídos por um átomo tendo um número de massa ou massa atômica selecionada. Exemplos de isótopos que podem ser incorporados nos compostos da invenção incluem isótopos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, flúor, e cloro, tais como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I respectivamente. A invenção inclui vários compostos isotopicamente rotulados como definido aqui, por exemplo, aqueles nos quais os isótopos radioativos, tais como ^3H e ^{14}C , ou aqueles nos quais isótopos não radioativos, tais como ^2H e ^{13}C estão presentes. Tais compostos isotopicamente rotulados são úteis nos estudos metabólicos (com ^{14}C), estudos cinéticos de reação (com, por exemplo ^2H ou ^3H), técnicas de detecção ou imagem, tal como tomografia de emissão de pósitron (PET) ou tomografia computadorizada de emissão fotônica única (SPECT) incluindo ensaios de distribuição de tecido de fármaco ou substrato, ou em tratamento radioativo de pacientes. Em particular, um ^{18}F ou composto rotulado pode ser particularmente

desejável para estudos PET ou SPECT. Os compostos isotopicamente rotulados de fórmula (I) podem geralmente ser preparados por técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica ou por processos análogos àqueles descritos nas preparações e exemplos acompanhantes empregando-se reagentes isotopicamente rotulados apropriados no lugar reagente não rotulado previamente empregado.

[0094] Também a substituição com isótopos mais pesados, particularmente deutério (isto é, ^2H ou D) pode fornecer certas vantagens terapêuticas resultante da estabilidade metabólica maior, por exemplo, necessidades de dosagem reduzida ou de meia-vida *in vivo* aumentadas ou uma melhora no índice terapêutico. É entendido que o deutério neste contexto é considerado como um substituinte de um composto da fórmula (I). A concentração de um tal isótopo mais pesado, especificamente deutério, pode ser definida pelo fator de enriquecimento isotópico. O termo "fator de enriquecimento isotópico" como empregado aqui significa a relação entre a abundância isotópica e a abundância natural de um isótopo especificado. Se um substituinte em um composto desta invenção é denotado deutério, tal composto possui um fator de enriquecimento isotópico para cada átomo de deutério designado de pelo menos 3500 (52,5% de incorporação de deutério em cada átomo de deutério designado), pelo menos 4000 (60% de incorporação de deutério), pelo menos 4500 (67,5% de incorporação de deutério), pelo menos 5000 (75% de incorporação de deutério), pelo menos 5500 (82,5% de incorporação de deutério), pelo menos 6000 (90% de incorporação de deutério), pelo menos 6333,3 (95% de incorporação de deutério), pelo menos 6466,7 (97% de incorporação de deutério), pelo menos 6600 (99% de incorporação de deutério), ou pelo menos 6633,3 (99,5% de incorporação de deutério).

[0095] Como empregado aqui, o termo "veículo farmacologicamente

aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, tensoativos, antioxidantes, conservantes (por exemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotônicos, agentes de retardante de absorção, sais, conservantes, estabilizantes de fármaco, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes adoçantes, agentes aromatizantes, corantes, e similar(es) e combinações destes, como seria conhecido por aqueles versados na técnica (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Exceto na medida em que qualquer veículo convencional seja compatível com o ingrediente ativo, seu uso nas composições terapêuticas ou farmacêuticas é contemplado.

[0096] O termo "uma quantidade terapeuticamente efetiva" de um composto da presente invenção refere-se a uma quantidade do composto da presente invenção que extrairá a resposta médica ou biológica de um indivíduo, por exemplo, redução ou inibição de uma enzima ou uma atividade de proteína, ou melhora de sintomas, alívio das condições, tornar mais lenta ou retardar a progressão da doença, ou prevenir uma doença, etc. Em uma modalidade não limitante, o termo "uma quantidade terapeuticamente efetiva" refere-se à quantidade de um composto da presente invenção que, quando administrada a um indivíduo, é efetiva para pelo menos parcialmente aliviar, inibir, prevenir e/ou melhorar uma condição, ou um distúrbio ou uma doença, ou pelo menos parcialmente inibir a atividade de um receptor ou enzima alvejado.

[0097] Como usado aqui, o termo "inibir", "inibição" ou "inibindo" refere-se à redução ou supressão de uma dada condição, sintoma, ou distúrbio, ou doença, ou uma significativa diminuição na atividade basal de um processo ou atividade biológica.

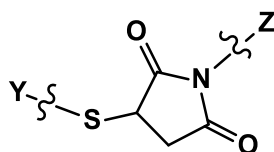
[0098] Como usado aqui, o termo "tratar", "tratando" ou

"tratamento" de qualquer doença ou distúrbio refere-se em uma modalidade, a melhorar a doença ou distúrbio (isto é, tornando mais lenta ou interrompendo ou reduzindo o desenvolvimento da doença ou pelo menos um dos sintomas clínicos da mesma). Em outra modalidade "tratar", "tratando" ou "tratamento" refere-se à aliviar ou melhorar pelo menos um parâmetro físico incluindo aqueles que podem não ser discerníveis pelo paciente. Em ainda outra modalidade, "tratar", "tratando" ou "tratamento" refere-se a modular a doença ou distúrbio, fisicamente, (por exemplo, estabilização de um sintoma discernível), fisiologicamente, (por exemplo, estabilização de um parâmetro físico), ou ambos. Em ainda outra modalidade, "tratar", "tratando" ou "tratamento" refere-se a prevenir ou retardar o início ou desenvolvimento ou progressão da doença ou distúrbio.

[0099] Como usado aqui, um indivíduo está "em necessidade de" um tratamento se tal indivíduo se beneficiasse biologicamente, medicamente ou em qualidade de vida de tal tratamento.

[00100] Como usado aqui, o termo "um, uma (a)," "um, uma (an)," "o, a (the)" e similares termos usados no contexto da presente invenção (especialmente no contexto das reivindicações) devem ser construídos para abranger tanto o singular quanto o plural, a **não ser** que de outra forma indicado aqui ou claramente contradito pelo contexto.

[00101] O termo "tiol-maleimida" como empregado aqui descreve um grupo formado por reação de um tiol com maleimida, tendo esta fórmula geral



onde Y e Z são grupos a ser conectados por meio da ligação de tiol-

maleimida e podem ser unidades ligantes, e podem ser ligados aos anticorpos ou cargas úteis. Em alguns exemplos, Y é um anticorpo manipulado de acordo com a invenção, e o átomo de enxofre mostrado na fórmula é de uma cisteína em um dos sítios de substituição descritos aqui; ao mesmo tempo em que Z representa uma unidade ligante conectada a uma carga útil.

[00102] “Unidade ligante” (LU) como empregado aqui se refere a uma conexão química covalente entre duas porções, tais como um anticorpo e uma carga útil. Cada LU pode ser compreendida de um ou mais componentes descritos aqui como L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆. A unidade ligante pode ser selecionada para fornecer espaçamento adequado entre as porções conectadas, ou para fornecer certas propriedades físico-químicas, ou para permitir clivagem da unidade ligante sob certas condições.

[00103] “Clivável” como empregado aqui se refere a um ligante ou unidade ligante (LU) que conecta duas porções por conexões covalentes, porém decompõe-se para cortar a conexão covalente entre as porções sob condições fisiológicas. A clivagem pode ser enzimática ou não enzimática, porém geralmente libera uma carga útil de um anticorpo sem degradar o anticorpo.

[00104] “Não clivável” como empregado aqui se refere a um ligante ou unidade ligante (LU) que não é suscetível a decompor-se sob condições fisiológicas. Ao mesmo tempo em que o ligante pode ser modificado fisiologicamente, ele mantém uma carga útil conectada ao anticorpo até o anticorpo ser substancialmente degradado, isto é, a degradação de anticorpo precede clivagem do ligante *in vivo*.

[00105] “Ciclo-octina” como empregado aqui se refere a um anel de 8 membros contendo uma ligação tripla carbono-carbono (acetileno). O anel é opcionalmente fundido a um ou dois anéis fenila, que podem ser substituídos com 1-4 C₁₋₄ alquila, C₁₋₄ alcóxi, halo, hidroxila, COOH,

COOL₁, -C(O)NH-L₁, O-L₁, ou grupos similares, e que podem conter N, O ou S como um membro de anel. Em modalidades preferidas, ciclo-octina pode ser um anel C₈ hidrocarboneto, particularmente um anel isolado que é saturado além da ligação tripla, e pode ser substituído com F ou hidróxi, e pode ser ligado a um ligante ou LU por meio de -O-, -C(O), C(O)NH, ou C(O)O.

[00106] “Ciclo-octeno” como empregado aqui refere-se a um anel de 8 membros contendo pelo menos uma ligação dupla, especialmente uma ligação dupla trans. O anel é opcionalmente fundido a um ou dois anéis fenila, que podem ser substituídos com 1-4 C₁₋₄ alquila, C₁₋₄ alcóxi, halo, hidroxila, COOH, COOL₁, -C(O)NH-L₁, O-L₁, ou grupos similares, e que podem conter N, O ou S como um membro de anel. Em modalidades preferidas, ciclo-octeno pode ser um anel C₈ hidrocarboneto isolado que é saturado além da ligação dupla trans e é opcionalmente substituído com F ou hidróxi, e pode ser ligado a um ligante ou LU por meio de -O-, -C(O), C(O)NH, ou C(O)O.

[00107] Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a não ser que de outra forma indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, “tal como”) fornecidos aqui é destinado meramente para iluminar melhor a invenção e não representa uma limitação no escopo da invenção de outro modo reivindicado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00108] FIG. 1. Plote de acessibilidade de superfície de resíduos de aminoácido em cadeia pesada IgG1 humana (A) e cadeia leve capa (B). Acessibilidade de superfície foi calculada usando Surface Racer 5.0 e é expressa como Angstrom ao quadrado [Å²].

[00109] FIG. 2. Localização de 92 mutações de TAG selecionadas na estrutura de um IgG1 humano com uma cadeia leve capa. Resíduos

selecionados para mutações de TAG são mostrados em preto em somente uma das duas cadeias pesadas e para uma das duas cadeias leves capa (1HZH.pdb). Estruturas são mostradas usando PyMOL, um pacote de modelagem molecular de fonte aberta (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.5.0. Schrödinger. LLC).

[00110] FIG. 3. O alinhamento de sequência de aminoácido das regiões constantes de cadeia pesada de trastuzumabe e anticorpo 14090. Resíduos mutados para Cys no anticorpo trastuzumabe e no anticorpo 14090 estão sublinhados. Os resíduos de aminoácido em cadeia pesada são numerados por sistema de numeração Eu (Edelman e outro(s), 1969).

[00111] FIG. 4. Alinhamento de sequência de aminoácido de regiões constantes de trastuzumab, IgG1 humano, IgG2, IgG3 e IgG4.

[00112] FIG. 5. O alinhamento de sequência de aminoácido das regiões constantes de cadeias leves capa e lambda humanas. A. Resíduos mutados para Cys na cadeia leve capa de trastuzumabe e na cadeia leve lambda de anticorpo 14090 são sublinhados. B. Resíduos selecionados para mutações Cys são mostrados em um modelo de estrutura de PyMOL de uma cadeia leve lambda humana (Protein Framework Databank entry 3G6D.pdb)

[00113] FIG. 6. Análise de anticorpos de Cys trastuzumabe por SDS-PAGE não redutor.

[00114] FIG. 7. Cromatografia de exclusão de tamanho do anticorpo mutante LC-S156C trastuzumabe (linha pontilhada) e trastuzumabe do tipo selvagem (linha sólida).

[00115] FIG. 8. Análise de trastuzumabe do tipo selvagem (A) e o anticorpo mutante LC-E158C trastuzumabe (B) por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (RP-HPLC).

[00116] FIG. 9. Análise de MS de anticorpo mutante LC-R108C trastuzumabe após purificação de proteína A (MS intacto).

[00117] FIG. 10. Estrutura de MC-MMAF.

[00118] FIG. 11. Análise de misturas de conjugação de anticorpos de Cys trastuzumabe com MC-MMAF por RP-HPLC. Traços de RP-HPLC das misturas de conjugação são mostrados como linhas pontilhadas. Traços de RP-HPLC de anticorpos não modificados são mostrados como linhas sólidas. A. LC-R108C-MMAF, B. HC-360C-MMAF, C. LC-S156C-MMAF, e D. ADC de HC-S275C-MMAF.

[00119] FIG. 12. Análise de misturas de conjugação de anticorpos de Cys trastuzumabe com MC-MMAF por RP-HPLC. Traços de RP-HPLC das misturas de conjugação são mostrados como linhas pontilhadas. Traços de RP-HPLC de anticorpos não modificados são mostrados como linhas sólidas. A. HC-S134C-MMAF, e B. ADC de HC-S136C-MMAF.

[00120] FIG. 13. Análise de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe por cromatografia de exclusão de tamanho analítica (AnSEC). Trastuzumabe ADC de HC-K290C-MMAF (linha pontilhada curta), trastuzumabe ADC de LC-R142C-MMAF (linha pontilhada), e trastuzumabe ADC de LC-L154C-MMAF (linha pontilhada) são comparados a trastuzumabe do tipo selvagem não modificado (linha sólida).

[00121] FIG. 14. Curva de fusão térmica de trastuzumabe do tipo selvagem não modificado e trastuzumabe HC-T335C-MMAF, trastuzumabe HC-S337C-MMAF e ADCs de HC-K360C-MMAF de trastuzumabe.

[00122] FIG. 15. Ensaios de proliferação celular para trastuzumabe LC-S159C-MMAF com A. HCC1954, B. clone 16 MDA-MB231 e C. células de clone 40 MDA-MB231.

[00123] FIG. 16. IC₅₀ de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe em ensaio de proliferação celular de clone 16 MDA-MB231.

[00124] FIG. 17. Ensaios de proliferação celular para ADC de HC-

S375C-MMAF de anticorpo 14090 com A. CMK11-5 e B. células Jurkat.

[00125] FIG. 18. Estudo farmacocinético de ADCs de LC-Cys-MMAF de trastuzumabe mostrando nenhuma perda de fármaco significativa. A. Trastuzumabe não conjugado do tipo selvagem, B. LC-K107C-MMAF, C. LC-R108C-MMAF, D. LC-L154C-MMAF, e E. ADC de LC-S159C-MMAF.

[00126] FIG. 19. Estudo farmacocinético de ADCs de HC-Cys-MMAF de trastuzumabe mostrando nenhuma perda de fármaco significativa. A. HC-K121C-MMAD, B. HC-L174C-MMAF, C. HC-E258C-MMAF, e D. ADC de HC-R292C-MMAF.

[00127] FIG. 20. Estudo farmacocinético de trastuzumabe Cys-MMAF ADCs mostrando perda de fármaco significativa. A. LC-T129C-MMAF, B. LC-E143C-MMAF, C. HC-K246C-MMAF, e D. ADC de HC-R344C-MMAF.

[00128] FIG. 21. Estudo farmacocinético de dois ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe mostrando liberação rápida *in vivo*. A. HC-T335C-MMAF e B. ADC de HC-S337C-MMAF.

[00129] FIG. 22. Estudos de eficácia *in vivo* de trastuzumabe ADCs Cys-MMAF em modelo de camundongo de xenoenxerto de clone 16 MDA-MB231.

[00130] FIG. 23: Tempos de retenção de trastuzumabe Pcl MMAF DAR 2 ADCs como medido por Cromatografia de Interação Hidrofóbica. ABA-MMAF é ligado a um resíduo Pcl substituído pelo resíduo HC ou LC indicado. A) ADCs conjugados a HC. B) ADCs conjugadas a LC. O tempo de retenção de anticorpo do tipo selvagem não conjugado é indicado (WT).

[00131] FIG. 24. Localização de sítios de carga útil selecionados na estrutura de um IgG1 humano com uma cadeia leve capa. Resíduos selecionados são mostrados em preto em somente uma das duas

cadeias pesadas e para uma das duas cadeias leves capa (1HZH.pdb). Três rotações da estrutura são mostradas usando PyMOL, um pacote de modelagem molecular de fonte aberta (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.5.0. Schrödinger, LLC).

[00132] FIG. 25. Estudo farmacocinético de trastuzumabe e ADCs de Cys-MMAF de anticorpo 14090 com DAR 4, 6 e 8 preparados com anticorpos com 2, 3 ou 4 mutações de Cys. ADCs de trastuzumabe de DAR 4: HC-E258C-LC-S159C-MMAF (A), HC-S375C-LC-S159C-MMAF (B), HC-E258C-LC-E165C-MMAF (C), HC-S375C-LC-E165C-MMAF (D), HC-E152C-LC-R142C-MMAF (E), HC-P171C-LC-R142C-MMAF, e HC-E152C-LC-S159C-MMAF (G); ADCs de anticorpo 14090 de DAR 4: HC-S375C-LC-A143C-MMAF (H), HC-K360C-LC-V159C-MMAF (I), e HC-S375C-LC-V159C-MMAF (J); K. ADCs de HC-K334C-S375C-LC-E165C-MMAF de trastuzumabe de DAR 6 e HC-K334C-K392C-LC-E165C-MMAF; L. ADCs de HC-K334C-K360C-S375C-LC-E165C-MMAF de trastuzumabe de DAR 8, HC-K334C-K360C-K392C-LC-E165C-MMAF e HC-K334C-S375C-K392C-LC-E165C-MMAF. O anticorpo 14090 é de reação cruzada de camundongo e, portanto, é liberado mais rapidamente do que então ADCs de trastuzumabe que não se ligam a quaisquer antígenos de camundongo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00133] A presente invenção fornece métodos de rotulação específica de sítio de anticorpos ou fragmento de anticorpos substituindo um ou mais aminoácidos de um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo em posições específicas com aminoácidos de cisteína ("Cys"), tal que os anticorpos manipulados ou fragmento de anticorpos sejam capazes de conjugação a vários agentes (por exemplo, agentes citotóxicos). A presente invenção também fornece imunocombinados que são produzidos usando os métodos descritos aqui.

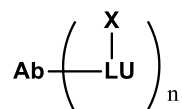
[00134] Quando a cisteína é manipulada em um anticorpo parental ou fragmento de anticorpo, o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo é primeiro recuperado do meio de expressão com cisteína ou glutathione (GSH) ligada ao(s) sítio(s) de cisteína manipulada por meio de uma ligação de dissulfeto (Chen e outro(s), (2009) mAbs 16, 353-571). A cisteína ou GSH ligada é em seguida removida em uma etapa de redução, que também reduz todas as ligações de dissulfeto intercadeia nativas do anticorpo parental ou fragmento de anticorpo. Em uma segunda etapa, estas ligações de dissulfeto são reoxidadas antes da conjugação ocorrer. A presente descrição mostra que quando a cisteína é manipulada em certos sítios, a etapa de reoxidação não procede bem, presumivelmente devido à formação das ligações de dissulfeto incorretas. Conseqüentemente, a presente invenção fornece conjuntos únicos de sítios na região constante de cadeia pesada de anticorpo e região constante de cadeia leve de anticorpo, respectivamente, onde a substituição de Cys como descrito aqui produz anticorpos modificados ou fragmento de anticorpos que realizam bem no processo de reoxidação, e também produzem imunocombinados estáveis e bem comportados.

[00135] A rotulação de anticorpo de sítio específico de acordo com a presente invenção pode ser ativada com uma variedade de reagentes de rotulação quimicamente acessíveis, tais como agentes anticâncer, fluoróforos, peptídeos, açúcares, detergentes, polietileno glicóis, potenciadores imunes, sondas de radioimageamento, profármacos, e outras moléculas.

[00136] Conseqüentemente, a presente invenção fornece métodos de preparação de imunocombinados homogêneos com uma relação fármaco-anticorpo definida para uso em terapia de câncer e outras indicações bem como reagentes de imagem. A presente invenção também fornece imunocombinados preparados assim, bem como

composições farmacêuticas compreendendo estes imunoconjugados. Os métodos da presente invenção podem ser usados em combinação com outros métodos de conjugação conhecidos na técnica.

[00137] As seguintes modalidades enumeradas representam certos aspectos e variações da invenção:



em que Ab representa um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína em um dos preferidos sítios de substituição de cisteína descritos aqui;

[00138] LU é uma Unidade Ligante como descrito aqui;

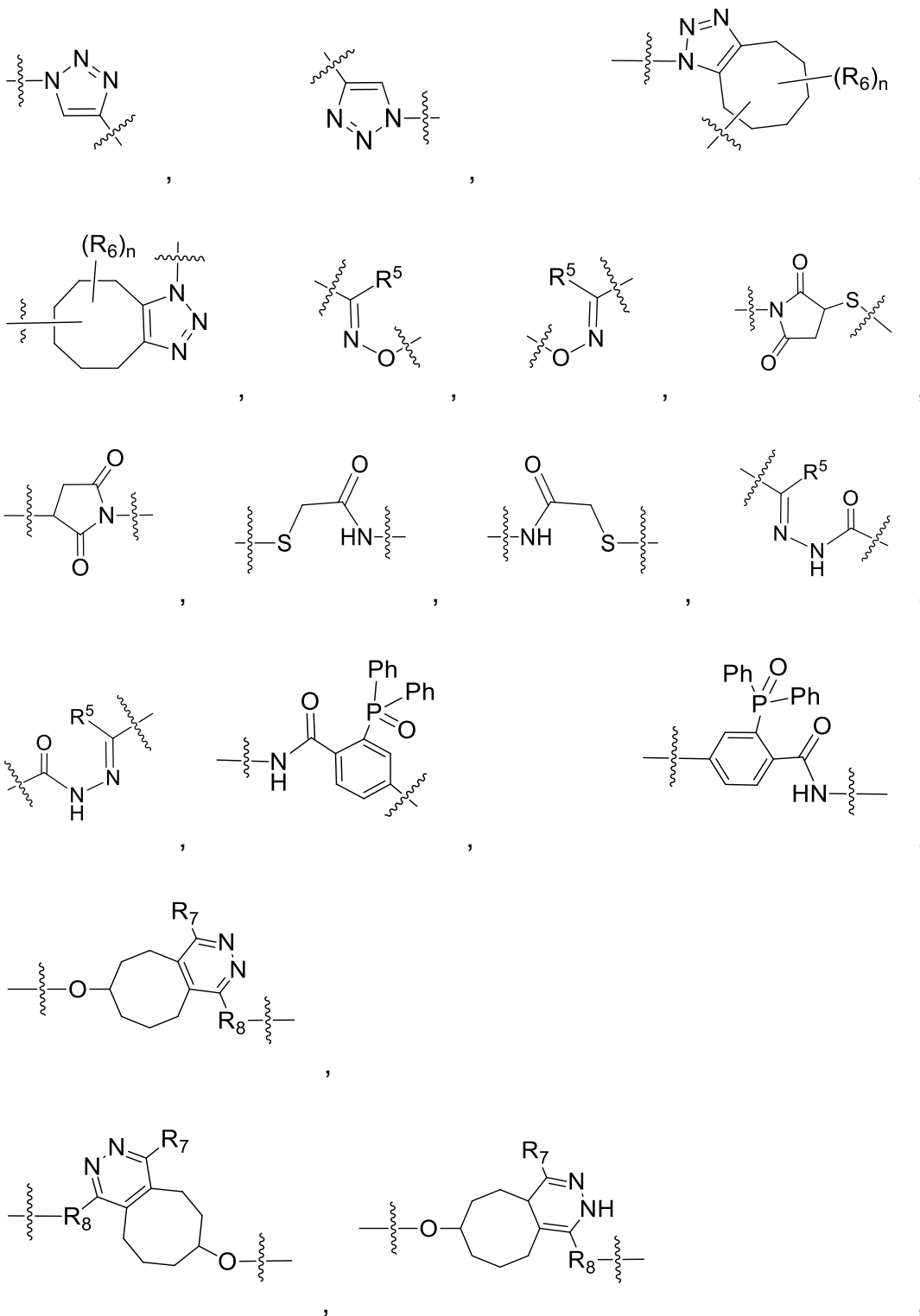
[00139] X é uma carga útil ou porção de fármaco;

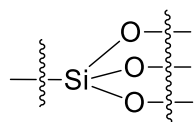
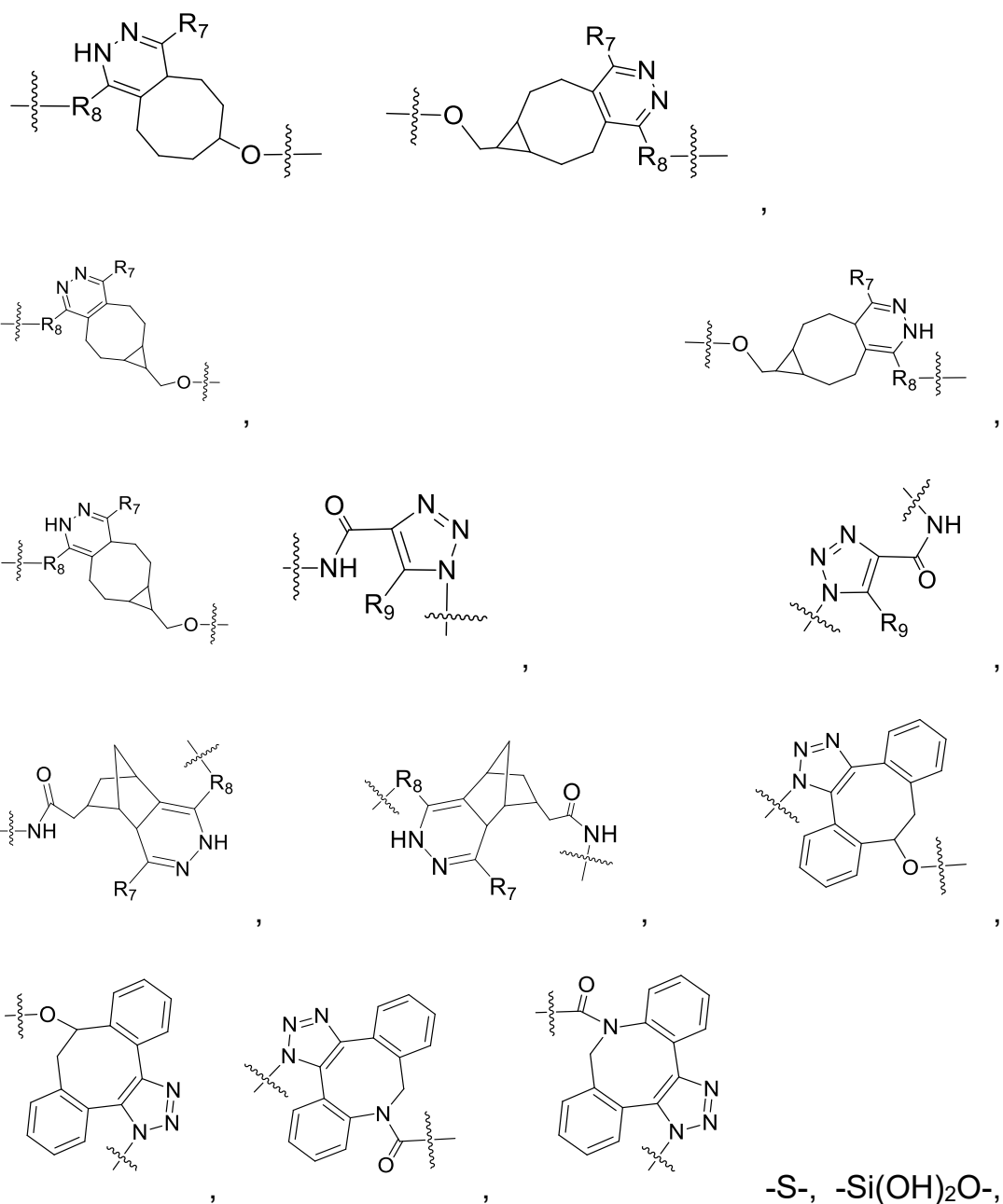
[00140] e n é um número inteiro de 1 a 16. Nestas modalidades, n é preferivelmente cerca de 2, cerca de 4, cerca de 6, ou cerca de 8. LU é tipicamente um grupo de fórmula $-L_1-L_2-L_3-L_4-L_5-L_6-$, em que L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 e L_6 são independentemente selecionados de $-A_1-$, $-A_1X^2-$ e $-X^2-$; em que:

A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,
,
 $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,

$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, ou $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação, R^8 ,





, -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

[00141] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁-4alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

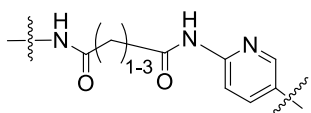
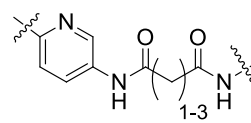
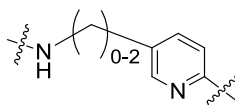
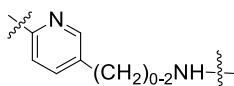
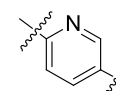
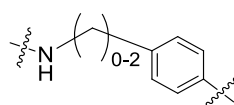
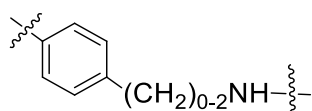
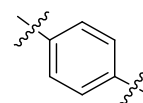
[00142] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁-

alquila, fenila ou C₁₋₄alquila substituída com de 1 a 3 grupos –OH;

[00143] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído com –C(=O)OH, benzila substituída com –C(=O)OH, C₁₋₄alcóxi substituído com –C(=O)OH e C₁₋₄alquila substituída com –C(=O)OH;

[00144] R⁷ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00145] R⁸ é independentemente selecionado de

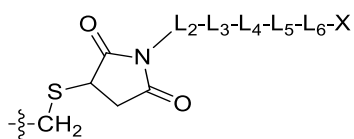


R⁹ é independentemente selecionado de H e C₁₋₆haloalquila;

[00146] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

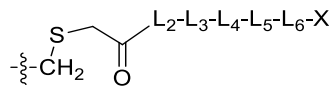
[00147] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

[00148] Em algumas destas modalidades, o imunoconjugado compreende um grupo da fórmula



IIA

ou



IIB

em que o átomo de enxofre é o enxofre de um resíduo de cisteína em um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo e é localizado em um dos sítios de substituição identificados aqui.

[00149] Em qualquer uma das modalidades anteriores, a substituição do sítio de cisteína pode ser uma posição que corresponde a um dos sítios identificados por um número de posição, mesmo se a posição do sítio na sequência tiver sido mudada por uma modificação ou truncação do anticorpo de tamanho natural. Sítios correspondentes podem ser facilmente identificados por alinhamento de um anticorpo ou fragmento com um anticorpo de tamanho natural.

1. Anticorpos Construídos de Cisteína Específicos do Sítio

Rotulagem específica do sítio

[00150] Os anticorpos (por exemplo, um anticorpo origem, opcionalmente contendo um ou mais aminoácidos não canônicos) da presente invenção são numerados de acordo com o sistema de numeração EU como mencionado em Edelman *et al.*, (1969) Proc. Natl. Acad. USA 63:78-85, exceto que a cadeia leve lambda é numerada de acordo com o sistema de numeração Kabat como mencionado em Kabat *et al.*, (1991) Quinta Edição. Publicação NIH No. 91-3242. Região constante humana IgG1 é usada como representativa em todo o Pedido. Entretanto, a invenção não está limitada a IgG1 humano; as posições de aminoácido correspondentes podem ser facilmente deduzidas por alinhamento de sequência. Por exemplo, a FIG. 4 mostra o alinhamento de sequência de regiões constantes de cadeia pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos, de modo que um sítio de construção de Cys identificado na região

constante de IgG1 possa ser facilmente identificado para IgG2, IgG3, e IgG4 como mostrado na FIG. 4. Para a região constante de cadeia leve, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 são iguais. A tabela 1 abaixo lista as posições de aminoácido na região constante da cadeia pesada de um anticorpo que pode ser substituído por uma cisteína. A tabela 2 lista as posições de aminoácido na região constante da cadeia leve κ de um anticorpo que pode ser substituído por uma cisteína. A tabela 3 lista as posições de aminoácido na região constante da cadeia leve λ de um anticorpo que pode ser substituído por uma cisteína.

Tabela 1. Sítios identificados de substituição de cisteína na região constante de cadeia pesada de IgG1 humano (Sítios numerados de acordo com o sistema de numeração EU).

Número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å ²]	Cys de HC Seleccionada	SEQ ID NO.
117	SER	128,0	HC-S117C	2
119	SER	79,1	HC-S119C	3
121	LYS	135,9	HC-K121C	4
124	SER	40,2	HC-S124C	5
132	SER	34,4	HC-S132C	6
134	SER	123,3	HC-S134C	7
136	SER	182,9	HC-S136C	8
139	THR	32,9	HC-T139C	9
152	GLU	52,1	HC-E152C	10
153	PRO	89,1	HC-P153C	11
155	THR	69,0	HC-T155C	12
157	SER	39,0	HC-S157C	13
164	THR	125,4	HC-T164C	14
165	SER	183,2	HC-S165C	15
169	THR	60,0	HC-T169C	16
171	PRO	33,3	HC-P171C	17
174	LEU	68,1	HC-L174C	18
176	SER	161,9	HC-S176C	19
177	SER	68,1	HC-S177C	20
189	PRO	86,4	HC-P189C	21
191	SER	126,8	HC-S191C	22
195	THR	111,3	HC-T195C	23

Número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Cys de HC Seleccionada	SEQ ID NO.
197	THR	89,8	HC-T197C	24
205	LYS	217,1	HC-K205C	25
207	SER	50,0	HC-S207C	26
212	ASP	97,0	HC-D212C	27
246	LYS	55,1	HC-K246C	28
258	GLU	42,1	HC-E258C	29
269	GLU	189,2	HC-E269C	30
274	LYS	137,8	HC-K274C	31
286	ASN	119,4	HC-N286C	32
288	LYS	181,8	HC-K288C	33
290	LYS	177,0	HC-K290C	34
292	ARG	251,5	HC-R292C	35
293	GLU	83,3	HC-E293C	36
294	GLN	73,5	HC-E294C	37
320	LYS	55,0	HC-K320C	38
322	LYS	78,3	HC-K322C	39
326	LYS	212,7	HC-K326C	40
330	ALA	96,3	HC-A330C	41
333	GLU	84,7	HC-E333C	42
334	LYS	49,6	HC-K334C	43
335	THR	70,1	HC-T335C	44
337	SER	15,1	HC-S337C	45
344	ARG	98,2	HC-R344C	46
355	ARG	249,4	HC-R355C	47
360	LYS	113,9	HC-K360C	48
362	GLN	40,8	HC-Q362C	49
375	SER	28,9	HC-S375C	50
382	GLU	21,8	HC-E382C	51
389	ASN	189,5	HC-N389C	52
390	ASN	36,4	HC-N390C	53
392	LYS	81,8	HC-K392C	54
393	THR	35,8	HC-T393C	55
398	LEU	110,9	HC-L398C	56
400	SER	81,3	HC-S400C	57
413	ASP	79,6	HC-D413C	58
415	SER	69,0	HC-S415C	59
422	VAL	80,8	HC-V422C	60

Tabela 2. Sítios de substituição de cisteína identificados na região constante de cadeia leve capa de IgG1 humano (Sítios numerados de acordo com Sistema de Numeração EU).

Número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å ²]	Cys de LC Seleccionada	SEQ ID NO.
107	LYS	90	LC-K107C	61
108	ARG	49	LC-R108C	62
109	THR	148	LC-T109C	63
112	ALA	50	LC-A112C	64
114	SER	39	LC-S114C	65
122	ASP	90	LC-D122C	66
123	GLU	51	LC-E123C	67
129	THR	41	LC-T129C	68
142	ARG	55	LC-R142C	69
143	GLU	117	LC-E143C	70
145	LYS	160	LC-K145C	71
152	ASN	157	LC-N152C	72
154	LEU	117	LC-L154C	73
156	SER	122	LC-S156C	74
159	SER	22	LC-S159C	75
161	GLU	66	LC-E161C	76
165	GLU	74	LC-E165C	77
168	SER	170	LC-S168C	78
169	LYS	241	LC-K169C	79
170	ASP	48	LC-D170C	80
182	SER	59	LC-S182C	81
183	LYS	131	LC-K183C	82
188	LYS	201	LC-K188C	83
190	LYS	167	LC-K190C	84
191	VAL	58	LC-V191C	85
197	THR	38	LC-T197C	86
199	GLN	127	LC-Q199C	87
203	SER	110	LC-S203C	88
206	THR	70	LC-T206C	89

Tabela 3. Sítios de substituição de cisteína identificados na cadeia leve lambda de IgG1 humano.

Número Kabat	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å ²]	Cys de LC Seleccionada	SEQ ID NO.
143	ALA	82	LC-A143C	92
145	THR	106	LC-T145C	93
147	ALA	14	LC-A147C	94
156	LYS	233	LC-K156C	95
159	VAL	28	LC-V159C	96
163	THR	157	LC-T163C	97
168	SER	166	LC-S168C	98

[00151] Por causa da alta homologia de sequência de regiões contantes de anticorpos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, descobertas da invenção não estão limitadas a quaisquer anticorpos específicos ou fragmentos de anticorpo.

[00152] Em uma modalidade, a presente invenção fornece imunocombinados compreendendo um anticorpo modificado ou um fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma substituição de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10) aminoácidos em sua região constante de cadeia pesada escolhida de posições identificadas na Tabela 1. Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334, 360, 375, e 392 da cadeia pesada. Por exemplo, um imunocombinado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que

referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de dois aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 121 e 124, 121 e 152, 121 e 171, 121 e 174, 121 e 258, 121 e 292, 121 e 333, 121 e 334, 121 e 360, 121 e 375, 121 e 392, 124 e 152, 124 e 171, 124 e 174, 124 e 258, 124 e 292, 124 e 333, 124 e 334, 124 e 360, 124 e 375, 124 e 392, 152 e 171, 152 e 174, 152 e 258, 152 e 292, 152 e 333, 152 e 334, 152 e 360, 152 e 375, 152 e 392, 171 e 174, 171 e 258, 171 e 292, 171 e 333, 171 e 360, 171 e 375, 174 e 258, 174 e 292, 174 e 333, 174 e 334, 174 e 360, 174 e 375, 174 e 392, 258 e 292, 258 e 333, 258 e 334, 258 e 360, 258 e 375, 258 e 392, 292 e 333, 292 e 334, 292 e 360, 292 e 375, 292 e 392, 333 e 334, 333 e 360, 333 e 375, 333 e 392; 334 e 360, 334 e 375, 334 e 392, 360 e 375, 360 e 392, ou 375 e 392 da cadeia pesada.

[00153] Em outra modalidade, um imunocombinado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de três aminoácidos por cisteína em sua região constante escolhida de posições 121, 124 e 152; 121, 124 e 171; 121, 124 e 174; 121, 124 e 258; 121, 124 e 292; 121, 124 e 333; 121, 124 e 334; 121, 124 e 360; 121, 124 e 375; 121, 124 e 392; 121, 152 e 171; 121, 152 e 174; 121, 152 e 258; 121, 152 e 292; 121, 152 e 333; 121, 152 e 334; 121, 152 e 360; 121, 152 e 375; 121, 152 e 392; 121, 171 e 174; 121, 171 e 258; 121, 171 e 292; 121, 171 e 333; 121, 171 e 334; 121, 171 e 360; 121, 171 e 375; 121, 171 e 392; 121, 174 e 258, 121, 174 e 292; 121, 174 e 333; 121, 174 e 334; 121, 174 e 360; 121, 174 e 375; 121, 174 e 392; 121, 258 e 292; 121, 258 e 333; 121, 258 e 334; 121, 258 e 360; 121, 258 e 375; 121, 258 e 392; 121, 292 e 333; 121, 292 e 334; 121, 292 e 360; 121, 292 e 375; 121, 292 e 392; 121, 333 e 334; 121, 333 e 360;

121, 333 e 375; 121, 333 e 392; 121, 334 e 360; 121, 334 e 375; 121, 334 e 392; 121, 360 e 375; 121, 360 e 392; 121, 375 e 392; 124, 152 e 171; 124, 152 e 174; 124, 152 e 258; 124, 152 e 292; 124, 152 e 333; 124, 152 e 334; 124, 152 e 360; 124, 152 e 375; 124, 152 e 392; 124, 171 e 174; 124, 171 e 258; 124, 171 e 292; 124, 171 e 333; 124, 171 e 334; 124, 171 e 360; 124, 171 e 375; 124, 171 e 392; 124, 174 e 258; 124, 174 e 292; 124, 174 e 333; 124, 174 e 334; 124, 174 e 360; 124, 174 e 375; 124, 174 e 392; 124, 258 e 292; 124, 258 e 333; 124, 258 e 334; 124, 258 e 360; 124, 258 e 375; 124, 258 e 392; 124, 292 e 333; 124, 292 e 334; 124, 292 e 360; 124, 292 e 375; 124, 292 e 392; 124, 333 e 360; 124, 333 e 334; 124, 333 e 375; 124, 333 e 392; 124, 334 e 360; 124, 334 e 375; 124, 334 e 392; 124, 360 e 375; 124, 360 e 392; 124, 375 e 392; 152, 171 e 174; 152, 171 e 258; 152, 171 e 292; 152, 171 e 333; 152, 171 e 334; 152, 171 e 360; 152, 171 e 375; 152, 171 e 392; 152, 174 e 258; 152, 174 e 292; 152, 174 e 333; 152, 174 e 334; 152, 174 e 360; 152, 174 e 375; 152, 174 e 392; 152, 258 e 292; 152, 258 e 333; 152, 258 e 334; 152, 258 e 360; 152, 258 e 375; 152, 258 e 392; 152, 292 e 333; 152, 292 e 334; 152, 292 e 360; 152, 292 e 375; 152, 292 e 392; 152, 333 e 334; 152, 333 e 360; 152, 333 e 375; 152, 333 e 392; 152, 334 e 360; 152, 334 e 375; 152, 334 e 392; 152, 360 e 375; 152, 360 e 392; 152, 375 e 392; 171, 174 e 258; 171, 174 e 292; 171, 174 e 333; 171, 174 e 334; 171, 174 e 360; 171, 174 e 375; 171, 174 e 392; 171, 258 e 292; 171, 258 e 292; 171, 258 e 333; 171, 258 e 334; 171, 258 e 360; 171, 258 e 375; 171, 258 e 392; 171, 292 e 333; 171, 292 e 334; 171, 292 e 360; 171, 292 e 375; 171, 292 e 392; 171, 333 e 334; 171, 333 e 360; 171, 333 e 375; 171, 333 e 392; 171, 334 e 360; 171, 334 e 392; 171, 360 e 375; 171, 360 e 392; 171, 375 e 392; 174, 258 e 292; 174, 258 e 333; 174, 258 e 334; 174, 258 e 360; 174, 258 e 375; 174, 258 e 392; 174, 292 e 333; 174, 292 e 334; 174, 292 e 360; 174, 292 e 375; 174, 292 e 392; 174, 333 e 334; 174, 333 e 360;

174, 333 e 375; 174, 333 e 392; 174, 334 e 360; 174, 334 e 375; 174, 334 e 392; 174, 360 e 375; 174, 360 e 392; 174, 375 e 392; 258, 292 e 333; 258, 292 e 334; 258, 292 e 360; 258, 292 e 375; 258, 292 e 392; 258, 333 e 360; 258, 333 e 375; 258, 333 e 392; 258, 334 e 360; 258, 334 e 375; 258, 334 e 392; 258, 360 e 375; 258, 360 e 392; 258, 375 e 392; 292, 333 e 334; 292, 333 e 360; 292, 333 e 375; 292, 333 e 392; 292, 334 e 360; 292, 334 e 375; 292, 334 e 392; 292, 360 e 375; 292, 360 e 392; 292, 375 e 392; 333, 334 e 360; 333, 334 e 375; 333, 334 e 392; 333, 360 e 375, 333, 360 e 392; 333, 375 e 392; 334, 360 e 375; 334, 360 e 392; ou 360, 375 e 392 da cadeia pesada.

[00154] Em uma modalidade, um imunocombinado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de quatro aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 152, 333, 375 e 392; ou 152, 334, 375 e 392 da cadeia pesada.

[00155] Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 2, 3, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 51, 53, 54, 56, 57, ou 60. Em outra modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou um fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 6, 7, 8, 15, 19, 20, 22, 23, 24, 27, 36, 37, 41, 49, 52, 55, 58, ou 59.

[00156] Em outra modalidade, a presente invenção fornece

imunocjugados compreendendo um anticorpo modificado ou um fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10) em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições identificadas na Tabela 2. Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocjugado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165 da cadeia leve, em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana. Por exemplo, um imunocjugado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de dois aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 107 e 108; 107 e 142; 107 e 145; 107 e 159; 107 e 161; 107 e 165; 108 e 142; 108 e 145; 108 e 159; 108 e 161; 108 e 165; 142 e 145; 142 e 159; 142 e 161; 142 e 165; 145 e 159; 145 e 161; 145 e 165; 159 e 161; 159 e 165; 161 e 165 da cadeia leve, em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana. Em outra modalidade, um imunocjugado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de três aminoácidos por cisteína em sua região constante escolhida de posições 107, 108 e 142; 107, 108 e 145; 107, 108 e 159; 107, 108 e 161; 107, 108 e 165; 107, 142 e 145; 107, 142 e 159; 107, 142 e 161; 107, 142 e 165; 107, 145 e 159; 107, 145 e 161; 107, 145 e

165; 107, 159 e 161; 107, 159 e 165; 107, 161 e 165; 108, 142 e 145; 108, 142 e 159; 108, 142 e 161; 108, 142 e 165; 108, 145 e 159; 108, 145 e 161; 108, 145 e 165; 108, 159 e 161; 108, 159 e 165; 108, 161 e 165; 142, 145 e 159; 142, 145 e 161; 142, 145 e 165; 142, 159 e 161; 142, 159 e 165; 142, 161 e 165; 145, 159 e 161; 145, 159 e 165; 145, 161 e 165; ou 159, 161 e 165 da cadeia leve, em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana.

[00157] Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 63, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 87, ou 88. Em outra modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 64, 66, 67, 84, 85, ou 89 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, ou 89.

[00158] Em outra modalidade, a presente invenção fornece imunocombinados compreendendo um anticorpo modificado ou um fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições identificadas na Tabela 3. Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de um ou mais aminoácidos com cisteína em sua

região constante escolhida de posições 143, 147, 159, 163, e 168 da cadeia leve, em que referida posições de cadeia leve são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve Lambda humana. Por exemplo, um imunocombinado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de dois aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 143 e 147; 143 e 159; 143 e 163; 143 e 168; 147 e 159; 147 e 163; 147 e 168; 159 e 163; 159 e 168; ou 163 e 168 da cadeia leve, em que referidas posições de cadeia leve são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve Lambda humana. Em outra modalidade, um imunocombinado da invenção compreende um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição de três aminoácidos com cisteína em sua região constante escolhida de posições 143, 147 e 159; 143, 147 e 163; 143, 147 e 168; 143, 159 e 163; 143, 159 e 168; 143, 163 e 168; 147, 159 e 163; 147, 159 e 168; 147, 163 e 168; ou 159, 163 e 168 da cadeia leve, em que referidas posições de cadeia leve são numeradas de acordo com o sistema Kabat, e em que a referida cadeia leve é cadeia leve Lambda humana.

[00159] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 92, 94, 96, 97 ou 98. Em outra modalidade específica, a presente invenção fornece um imunocombinado compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo

do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende SEQ ID NO: 93 ou 95.

[00160] Em uma modalidade, o imunoconjugado pode ter um DAR de cerca de 2 ou cerca de 4. Em uma modalidade, a presente invenção fornece imunoconjugados compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição Cys de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10) aminoácidos em sua região constante de cadeia pesada escolhida de posições identificadas na Tabela 1, e uma substituição Cys de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10) aminoácidos em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições identificadas na Tabela 2 ou Tabela 3. Em uma modalidade, a presente invenção fornece imunoconjugados compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição Cys de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia pesada escolhida de posições 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334, 360, 375 e 392; e uma substituição Cys de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições 107, 108, 142, 145, 159, 161, e 165, em que a referida cadeia leve é cadeia leve capa humana. Em uma modalidade, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição

Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 107 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 108 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 142 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 145 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 161 de uma cadeia leve capa humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em uma modalidade, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção compreende uma substituição Cys na posição 375 e na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em uma modalidade um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição Cys na posição 334 e na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em outro exemplo, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição Cys na posição 334 e na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em uma modalidade, imunoconjugados daquelas combinações podem ter um DAR de cerca de 4 ou cerca de 6.

[00161] Em uma modalidade, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode

compreender uma substituição Cys na posição 334, na posição 375 e na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em uma modalidade, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição Cys na posição 333, na posição 375 e na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 165 de uma cadeia leve capa humana. Em uma modalidade, aquelas combinações podem ter uma DAR de cerca de 4, 6, ou 8.

[00162] Em uma modalidade, a presente invenção fornece imunocombinados compreendendo um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo, e uma porção de fármaco, em que referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo compreende uma substituição Cys de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia pesada escolhida de posições 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334 360, 375 e 392; e uma substituição Cys de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições 143, 147, 159, 163, e 168, em que a referida cadeia leve é cadeia leve Lambda humana. Por exemplo, um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 121 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de

uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 124 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 152 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 171 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de

uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 174 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 258 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 292 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de

uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 333 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 334 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 360 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de

uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 375 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 143 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 147 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 159 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 163 de uma cadeia leve lambda humana; ou uma substituição Cys na posição 392 de uma cadeia pesada, e uma substituição Cys na posição 168 de uma cadeia leve lambda humana;

[00163] Em uma modalidade da invenção, a substituição de aminoácido descrita aqui é cisteína compreendendo um grupo tiol. Em alguns aspectos da invenção, o grupo tiol é utilizado para conjugação química, e é ligado a uma unidade de ligação (LU) e/ou porção de fármaco. Em algumas modalidades, os imunocombinados da invenção compreendem uma porção de fármaco selecionada do grupo consistindo em um inibidor de V-ATPase, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizador de microtúbulo, um desestabilizador de microtúbulo, uma auristatina, uma dolastatina,

um maitansinóide, um MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, inibidores de proteasoma, um inibidor de reações de transferência de fosforila em mitocôndria, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de cinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de cinesina, um inibidor de HDAC, um agente de dano de DNA, um agente de alquilação de DNA, um intercalador de DNA, um aglutinante de ranhuma menor de DNA e um inibidor de DHFR. Em algumas modalidades, os imunocombinados da invenção compreendem uma porção de fármaco que é um agente anticâncer. O anticorpo modificado ou fragmentos de anticorpo da presente invenção podem ser quaisquer formatos conhecidos na técnica, tais como um anticorpo monoclonal, quimérico, humanizados, totalmente humanos, biespecíficos, ou multiespecíficos ou fragmento de anticorpo dos mesmos.

[00164] De acordo com a presente invenção, a cadeia leve e/ou cadeia pesada de anticorpo modificado (ou fragmento de anticorpo do mesmo) pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais substituições de cisteína em suas regiões constantes. Em uma modalidade, os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpo contêm 2, 4, 6, 8, ou mais substituições de cisteína em suas regiões constantes. Em algumas modalidades, o anticorpo modificado, fragmento de anticorpo ou imunocombinado dos mesmos compreende 2 ou 4 substituições Cys.

[00165] Em uma modalidade, o anticorpo parental (anticorpo sem substituição de cisteína) é um anticorpo IgG, IgM, IgE, ou IgA. Em uma modalidade específica, o anticorpo parental é um anticorpo IgG1. Em outra modalidade específica, o anticorpo parental é um anticorpo IgG2, IgG3, ou IgG4.

[00166] A presente invenção também fornece anticorpos

modificados ou fragmentos de anticorpo dos mesmos compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia pesada escolhida de posições identificadas na Tabela 1. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos dos mesmos compreendendo uma substituição de um ou mais aminoácidos em sua região constante de cadeia leve escolhida de posições identificadas na Tabela 2 ou Tabela 3.

[00167] Em certas modalidades, os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos fornecidos aqui são rotulados usando os métodos da invenção em combinação com outros métodos de conjugação conhecidos na técnica incluindo, porém não limitados a, conjugação quimiosseletiva através de lisina, histidina, tirosina, formil-glicina, pirrolisina, pirrolina-carbóxi-lisina, aminoácidos não naturais, e rótulos de proteína para conjugação mediada por enzima (por exemplo, rótulos S6).

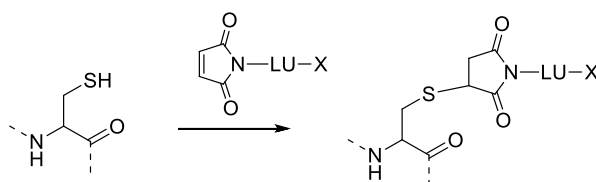
2. Química de Conjugação

[00168] O anticorpo conjugado ou fragmento de anticorpo do mesmo fornecido aqui é produzido por modificação pós-translacional de pelo menos um resíduo de cisteína que foi incorporado no anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo como descrito acima por métodos de rotulação de sítio específico. O anticorpo conjugado ou fragmento de anticorpo podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica para conjugação de uma carga útil de interesse aos resíduos de cisteína que ocorrem naturalmente em proteínas, e por métodos descritos para conjugação para proteínas manipuladas para conter um resíduo de cisteína adicional substituído por outro aminoácido de uma sequência de proteína natural.

[00169] Em certas modalidades os anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecidos aqui são conjugados

usando métodos conhecidos em que a cisteína incorporada (cys) é conjugada a um derivado de maleimida como o esquema la abaixo. Anticorpos modificados da invenção que sofrem este tipo de conjugação contêm uma ligação tiol-maleimida.

Esquema la. Conjugação por meio de formação de aduto de tiol-maleimida.



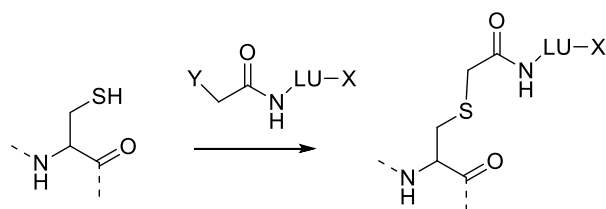
em que:

[00170] LU é uma Unidade Ligante (LU), e

[00171] X é uma carga útil ou porção de fármaco.

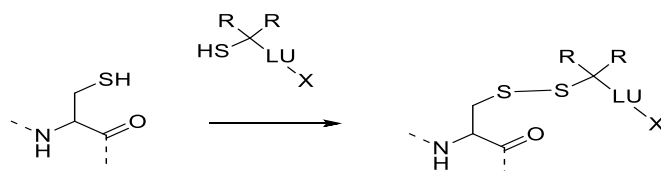
[00172] Em outras modalidades, a Cys incorporada nos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo é conjugada por reação com um composto de alfa-halo carbonila tal como um cloro-, bromo-, ou iodo-acetamida como mostrado no esquema lb abaixo. É entendido que outros grupos de saída além de halogênio, tais como tosilato, triflato e outros sulfonatos alquila ou arila, podem ser usados como o grupo Y de saída. Enquanto que o Esquema lb representar a reação de uma Cys tiol com um alfa-halo acetamida, o método inclui qualquer alquilação de um enxofre de uma Cys incorporada com um grupo da fórmula Y-CHR-C(=O)-, onde R é H ou C₁₋₄ alquila, Y é um grupo de saída (tipicamente Cl, Br, ou I, e opcionalmente um alquilsulfonato ou arilsulfonato); não está limitado às amidas.

Esquema lb. Conjugação por meio de reação com um composto de alfa-halo carbonila.



Y é um grupo de saída (Cl, Br, I, OTs, OTf, e similares)
 LU é uma unidade ligante
 X é uma carga útil ou porção de fármaco

[00173] Alternativamente, a Cys incorporada nos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo pode ser conjugada por reação com um tiol externo sob condições que induzem formação de uma ligação de dissulfeto entre o tiol externo e o átomo de enxofre do resíduo de cisteína incorporada como mostrado no esquema 1c abaixo. Nestes exemplos, R pode ser H; entretanto, compostos onde um ou ambos os grupos R representam um grupo alquila, por exemplo, Metila, foi descoberta aumentar a estabilidade do dissulfeto. Esquema 1c. Conjugação por meio de formação de dissulfeto.



Cada R é independentemente H ou C₁₋₄ alquila
 LU é uma unidade ligante
 X é uma carga útil ou porção de fármaco

[00174] A título de exemplo apenas, tais modificações pós-translacionais são ilustradas nos esquemas (1a)-(1c) acima, onde a estrutura de partida representa uma cisteína incorporada na cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo em um dos sítios específicos identificados aqui. Métodos para realizar cada um destes métodos de conjugação são bem conhecidos na técnica. Um anticorpo pode ser modificado por estes métodos em suas cadeias leves, ou suas cadeias pesadas, ou em ambas as cadeias leves e pesadas. Um anticorpo no qual cada cadeia leve ou cada cadeia pesada foi modificada para

conter uma única cisteína incorporada geralmente conterá dois sítios de conjugação, visto que um anticorpo tipicamente contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas.

[00175] Em conjugação, os anticorpos modificados da invenção tipicamente contêm 1-12, frequentemente 2-8, e preferivelmente 2, 4 ou 6 porções –LU-X (Unidade Ligante-Carga Útil). Em algumas modalidades, uma cadeia leve ou cadeia pesada de anticorpo é modificada para incorporar dois novos resíduos Cys em dois dos sítios específicos identificados aqui para substituições de Cys (ou alternativamente uma Cys é incorporada na cadeia leve e um na cadeia pesada), então o anticorpo tetramérico finalmente contém quatro sítios de conjugação. Similarmente o anticorpo pode ser modificado por substituição de 3 ou 4 de seus aminoácidos nativos por Cys nos sítios específicos identificados aqui, em cadeia leve ou cadeia pesada ou uma combinação das mesmas, resultando em 6 ou 8 sítios de conjugação no tetramérico anticorpo.

[00176] X nestes conjugados representa a carga útil, que pode ser qualquer porção química que é útil para ligação a um anticorpo. Em algumas modalidades, X é uma porção de fármaco selecionada de é uma citotoxina, um agente anticâncer, um agente anti-inflamatório, um agente antifúngico, um agente antibacteriano, um agente antiparasítico, um agente antiviral, um imunopotenciador, e um agente anestésico ou qualquer outra porção terapêutica, ou biologicamente ativa ou porção de fármaco. Em outras modalidades, X é um rótulo tal como uma sonda biofísica, um fluoróforo, uma sonda de afinidade, uma sonda espectroscópica, uma sonda radioativa, um rótulo giratório, ou um ponto quântico. Em outras modalidades, X é uma porção química que modifica as propriedades físico-químicas de anticorpo, tal como uma molécula de lipídeo, um polietileno glicol, um polímero, um polissacarídeo, uma lipossoma, ou um quelante. Em outras

modalidades, X é uma biomolécula funcional ou detectável, tal como um ácido nucleico, um ácido ribonucleico, uma proteína, um peptídeo (por exemplo, uma enzima ou receptor), um açúcar ou polissacarídeo, um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo. Em outras modalidades, X é uma porção de ancoramento, tal como uma nanopartícula, uma partícula de PLGA, ou uma superfície, ou qualquer porção de ligação para especificamente ligar o conjugado à outra porção, tal como um rótulo de histidina, poli-G, biotina, avidina, estreptavidina, e similares. Em outras modalidades, X é um grupo funcional reativo que pode ser usado para ligar o conjugado de anticorpo à outra porção química, tal como uma porção de fármaco, um rótulo, outro anticorpo, outra porção química, ou uma superfície.

[00177] A Unidade Ligante (LU) pode ser qualquer porção química adequada que covalentemente liga o grupo reativo de tiol (por exemplo, maleimida, alfa-halo carbonila, vinil carbonila (por exemplo, acrilato ou acrilamida), vinil sulfona, vinilpiridina, ou tiol) a uma carga útil. Muitas LUs adequadas são conhecidas na técnica. Por exemplo, LU pode ser compreendida de um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais do que seis ligantes referidos aqui como L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆. Em certas modalidades a LU compreende um ligante selecionado de um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou qualquer combinação dos mesmos, e a LU opcionalmente contém um espaçador autoimolativo.

[00178] Em algumas modalidades, LU é um grupo da fórmula -L₁-L₂-L₃-L₄- ou -L₁-L₃-L₄-L₅-L₆-. Grupos de ligação L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆ para uso em LU incluem grupos alquilenos -(CH₂)_n- (onde n é 1-20, tipicamente 1-10 ou 1-6), unidades de etileno glicol (-CH₂CH₂O-)_n (onde n é 1-20, tipicamente 1-10 ou 1-6), amidas -C(=O)-NH- ou -NH-C(=O)-, ésteres -C(=O)-O- ou -O-C(=O)-, anéis tendo dois pontos de

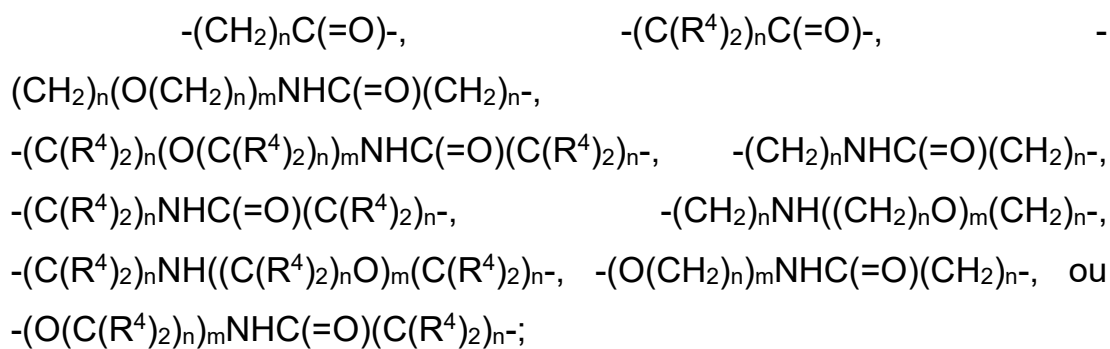
ligação disponíveis, tais como grupos fenila divalente, C₃₋₈ cicloalquila ou C₄₋₈ heterociclila, aminoácidos –NH-CHR*-C=O- ou –C(=O)-CHR*-NH-, onde R* é a cadeia lateral de um aminoácido conhecido (frequentemente um dos aminoácidos canônicos, porém também incluindo, por exemplo, norvalina, norleucina, homoserina, homocisteína, fenilglicina, citrulina, e outros denominados alfa-aminoácidos), polipeptídeos de aminoácidos conhecidos (por exemplo, dipeptídeos, tripeptídeos, tetrapeptídeos, etc.), ligações tiol-maleimida (a partir de adição de –SH à maleimida), -S-CR₂- e outros ésteres de tiol, tal como -S-CR₂-C(=O)- ou -C(=O)-CR₂-S-, onde R é como definido acima para o Esquema Ic, -CH₂-C(=O)-, e dissulfetos (-S-S-), bem como combinações de quaisquer destes com outros ligantes descritos abaixo, por exemplo, uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

[00179] Em algumas modalidades quando LU é -L₁-L-L₃-L₄-L₅-L₆-, L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆ podem ser selecionados de:

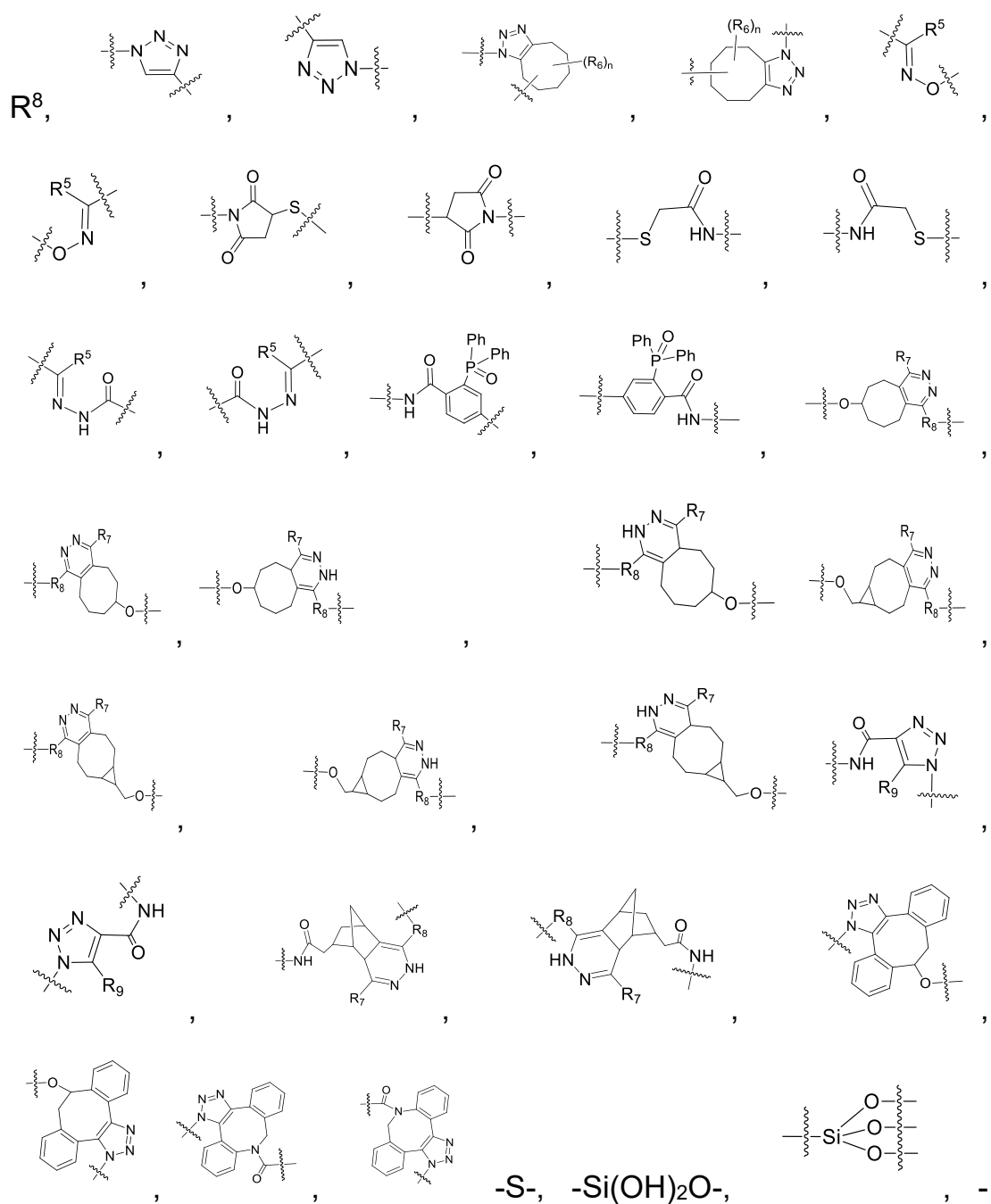
-A₁-, -A₁X²- e -X²-; onde:

A₁ é -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-,
 -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-,
 -((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-,
 -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-,
 NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-,
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-

,



[00180] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,



$\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)-}$, $-\text{C(=O)NH-}$ e $-\text{NHC(=O)-}$;

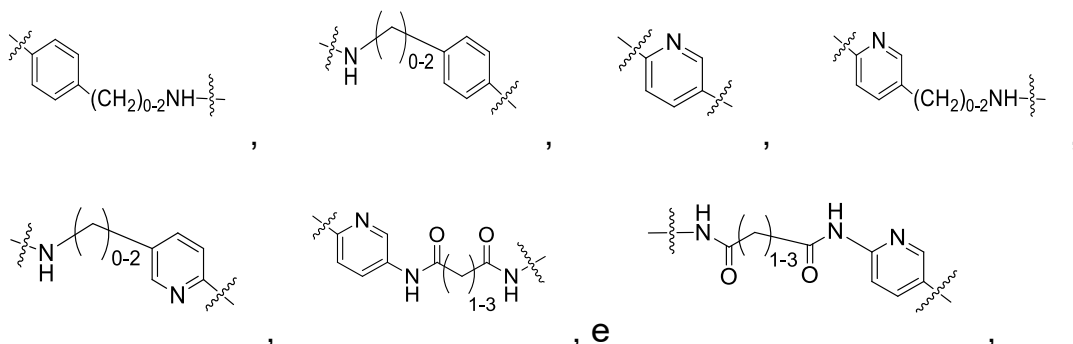
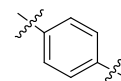
[00181] cada R^4 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, $-\text{C(=O)OH}$ e $-\text{OH}$,

[00182] cada R^5 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila ou C_{1-4} alquila substituído por 1 a 3 grupos $-\text{OH}$;

[00183] cada R^6 é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por $-\text{C(=O)OH}$, benzila substituída por $-\text{C(=O)OH}$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-\text{C(=O)OH}$ e C_{1-4} alquila substituída por $-\text{C(=O)OH}$;

[00184] R^7 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00185] R^8 é independentemente selecionado de



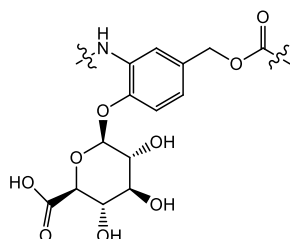
[00186] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00187] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

[00188] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

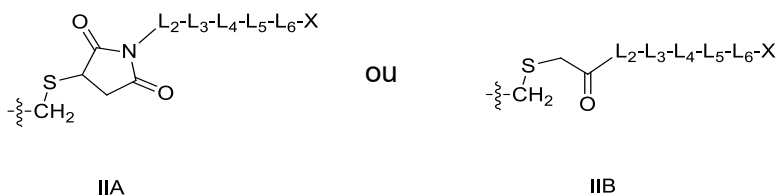
[00189] Em algumas modalidades, pelo menos um de L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 e L_6 é um ligante estável, ou não clivável. Em algumas modalidades, pelo menos um de L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 e L_6 é um ligante

clivável, que pode ser quimicamente clivável (hidrazonas, dissulfetos) ou enzimaticamente clivável. Em algumas modalidades, o ligante enzimaticamente clivável é aquele facilmente clivado por uma peptidase: O ligante Val-Cit (valina-citrulina), um dipeptídeo de dois aminoácidos conhecidos, é um tal ligante. Em outras modalidades, o ligante enzimaticamente clivável é aquele que é iniciado por atividade de uma glucuronidase:



é um exemplo de tal ligante, que também compreende um espaçador autoimolativo que desfaz-se espontaneamente sob condições fisiológicas, visto que a glucuronidase cliva a ligação glicosídica.

[00190] Em algumas modalidades, o imunoc conjugado da invenção compreende um resíduo de cisteína modificada da fórmula IIA ou IIB:



em que $-\text{CH}_2\text{-S-}$ representa a cadeia lateral de de Cys incorporada em um dos sítios de substituição de Cys selecionados descritos aqui, e $\text{L}_2 - \text{L}_6$ e X representam grupos de ligação e cargas úteis, respectivamente, como também descrito aqui. Em algumas modalidades de IIA, L_2 é uma ligação. Em algumas modalidades de IIB, L_2 é NH ou O. Em algumas modalidades de ambos IIA e IIB, L_3 é selecionado de $(\text{CH}_2)_{1-10}$ e $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-6}$. L_4 , L_5 e L_6 são ligantes opcionais adicionais selecionados daqueles descritos aqui. Em certas modalidades, L_6 pode ser uma carbonila (C=O) ou um ligante que

compreende um espaçador autoimolativo.

[00191] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde:

[00192] L_1 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00193] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00194] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável, e

[00195] L_4 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

[164] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

[00196] L_1 é um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00197] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00198] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável, e

[00199] L_4 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que

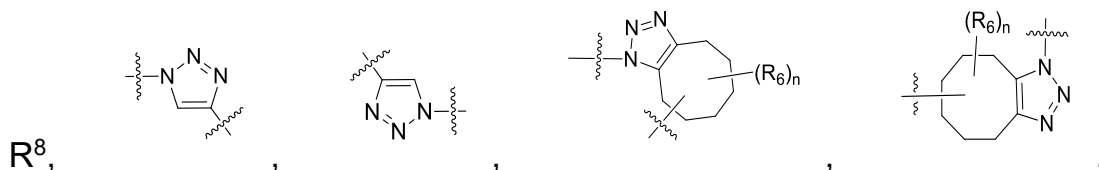
compreende um espaçador autoimolativo.

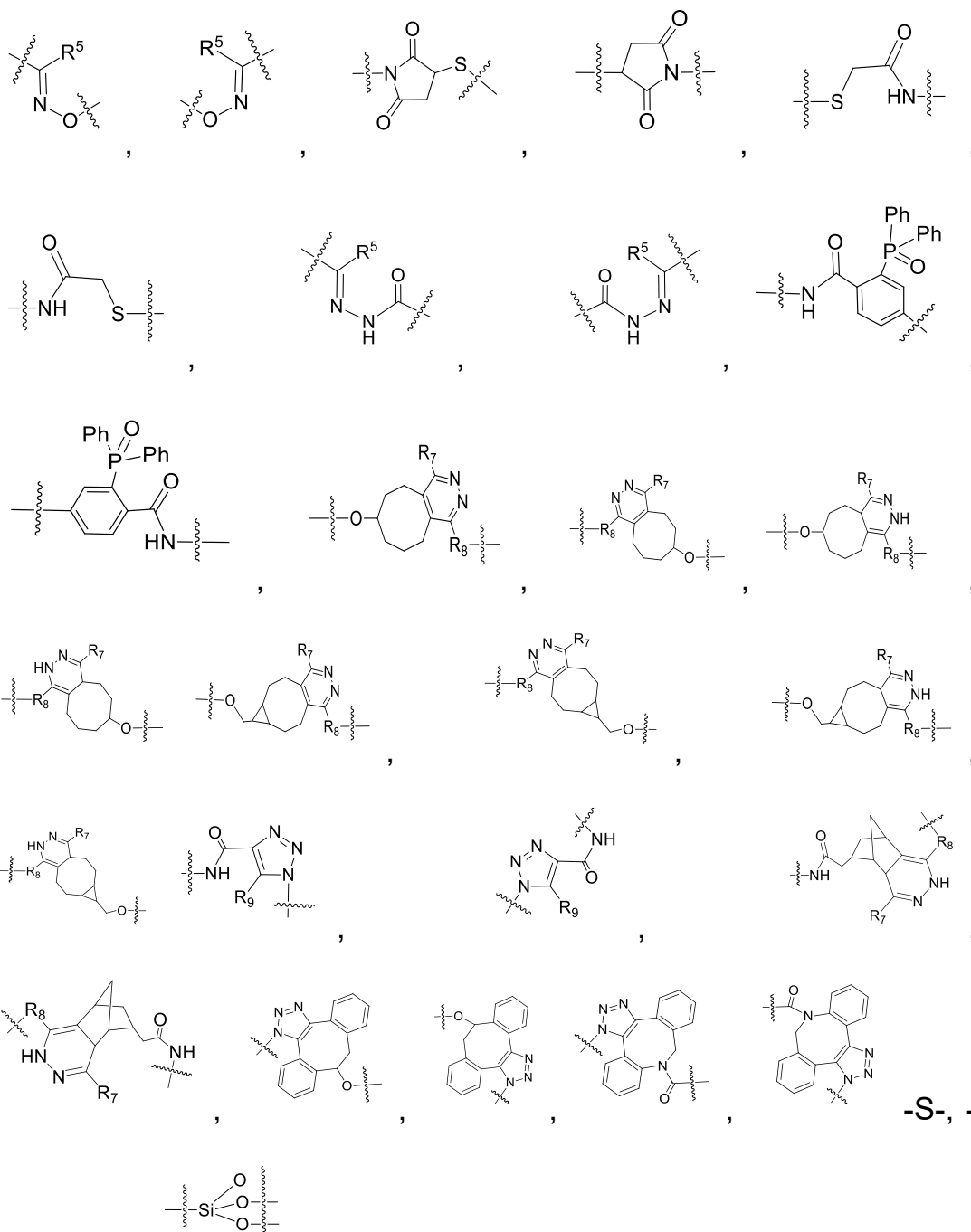
[00200] Em algumas das modalidades de LU pelo menos um de L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆ é um ligante clivável, e LU é considerada clivável. Similarmente, em algumas das modalidades de LU pelo menos um de L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ e L₆ é um ligante não clivável. Em certas destas modalidades, cada ligante de LU é não clivável, e LU é considerada não clivável.

[00201] Em algumas das modalidades anteriores, em que LU é -L₁-L₂-L₃-L₄-, pelo menos um de L₁, L₂, L₃ e L₄ é um ligante selecionado de -A₁-, -A₁X²- e -X²-; onde:

A₁ é -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-,
 -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-,
 -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-,
 -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -
 NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-,
 -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, ou
 -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

[00202] cada X² é independentemente selecionado de uma ligação,





Si(OH)₂O-, ---Si--- , $\text{---CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)NH---}$, $\text{---CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)---}$, ---C(=O)NH--- e ---NHC(=O)--- ;

[00203] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, ---C(=O)OH e ---OH ,

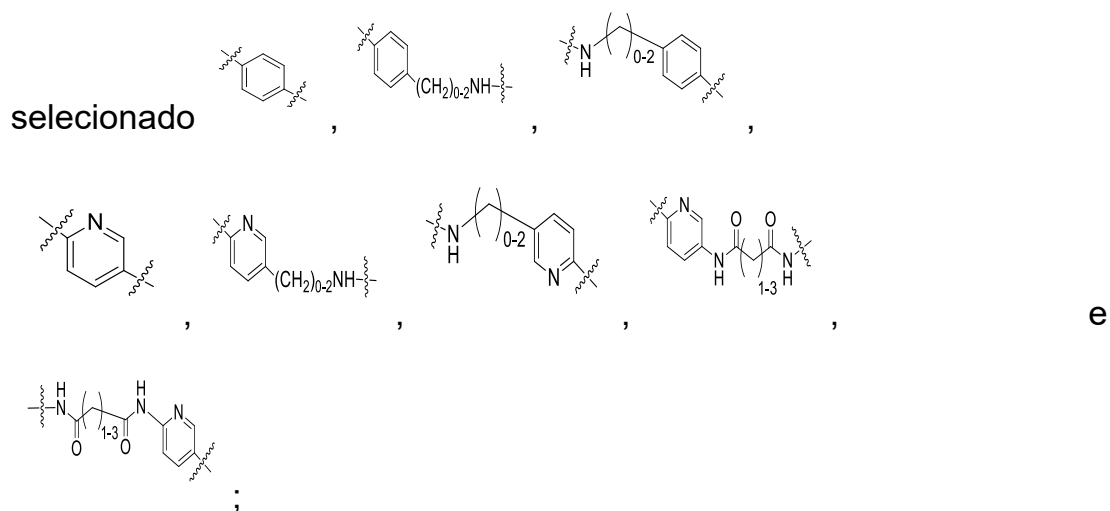
[00204] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄alquila substituída por 1 a 3 grupos ---OH ;

[00205] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor,

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

[00206] R^7 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00207] R^8 é independentemente



[00208] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00209] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

[00210] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

[00211] Nestas modalidades, os outros ligantes de LU são independentemente selecionados de uma ligação, $-A^1-$, $-A_1X^2-$, $-X^2-$, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável e um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

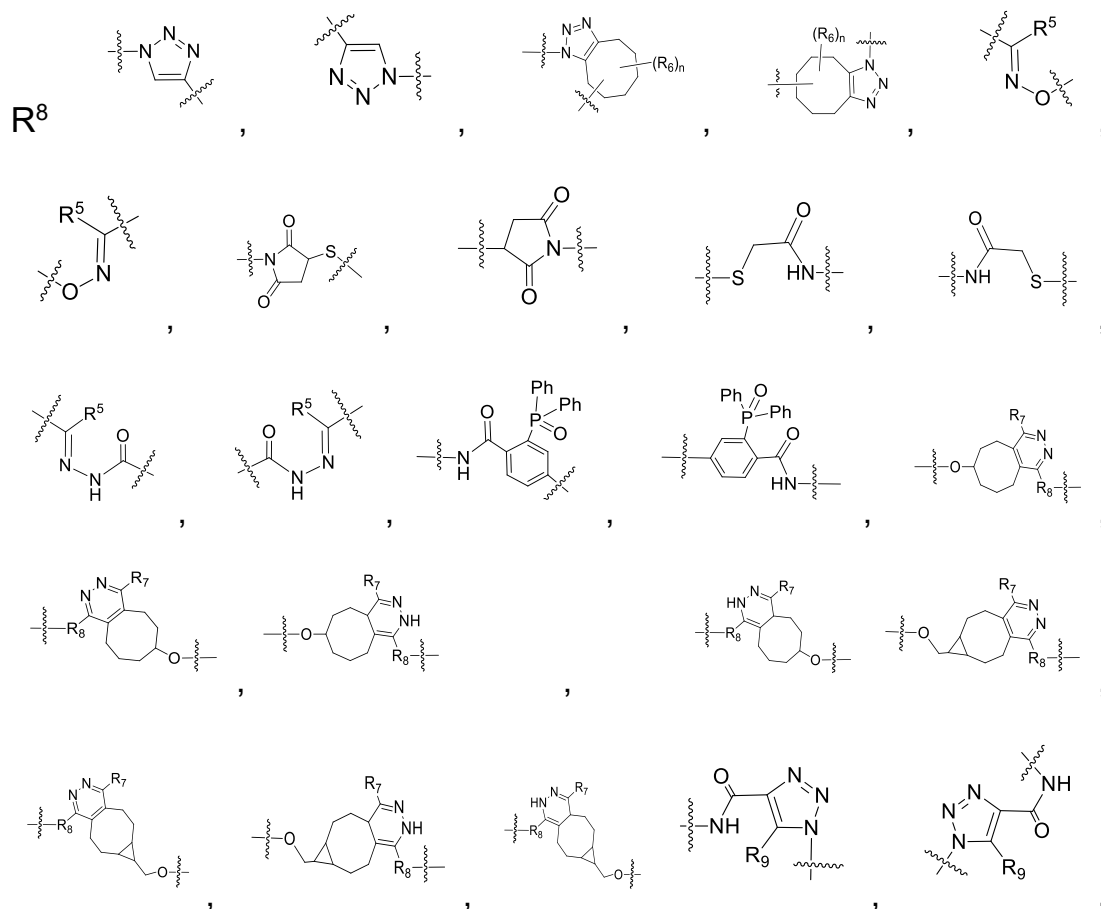
[00212] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

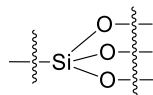
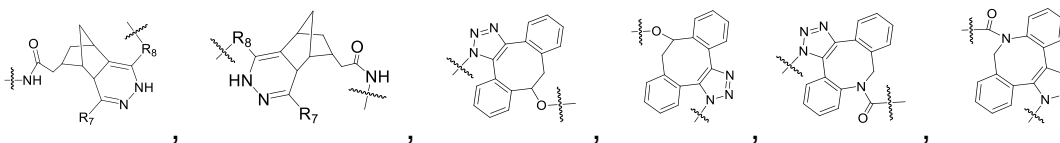
L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$; onde:

A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, -

$(O(C(R^4)_2)_n)_{m^-}$, $-((CH_2)_nO)_{m^-}$, $-((C(R^4)_2)_nO)_{m^-}$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_{n^-}$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-$
 $(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $NHC(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-$
 $S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-$
 $C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-C(=O)(CH_2)_{n^-}$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-$
 $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n^-}$, $-$
 $(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n^-}$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_{n^-}$, ou $-$
 $(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n^-}$;

[00213] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,





-S-, -Si(OH)₂O-, $\text{-CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $\text{-CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)-}$, -C(=O)NH- e -NHC(=O)- ;

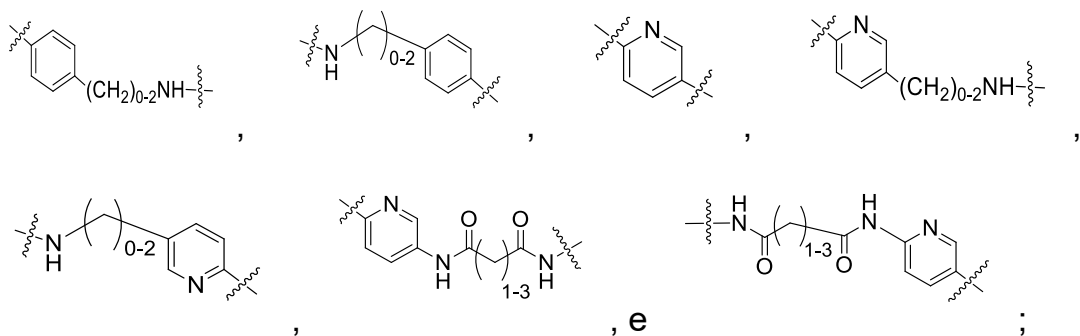
[00214] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

[00215] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituído por 1 a 3 grupos -OH;

[00216] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C₁₋₄ alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄ alquila substituído por -C(=O)OH;

[00217] R⁷ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00218] R⁸ é independentemente selecionado de ,



[00219] R⁹ é independentemente selecionado de H e C₁₋₆ haloalquila;

cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

[00220] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9;

[00221] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00222] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável, e

[00223] L_4 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

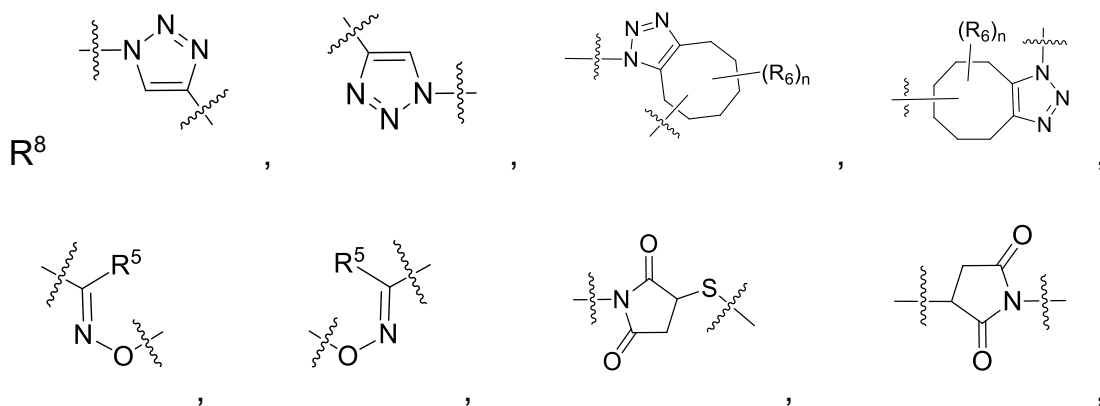
[00224] Em certas modalidades, L_1 é $C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-$, então LU é $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-L_2-L_3-L_4-$.

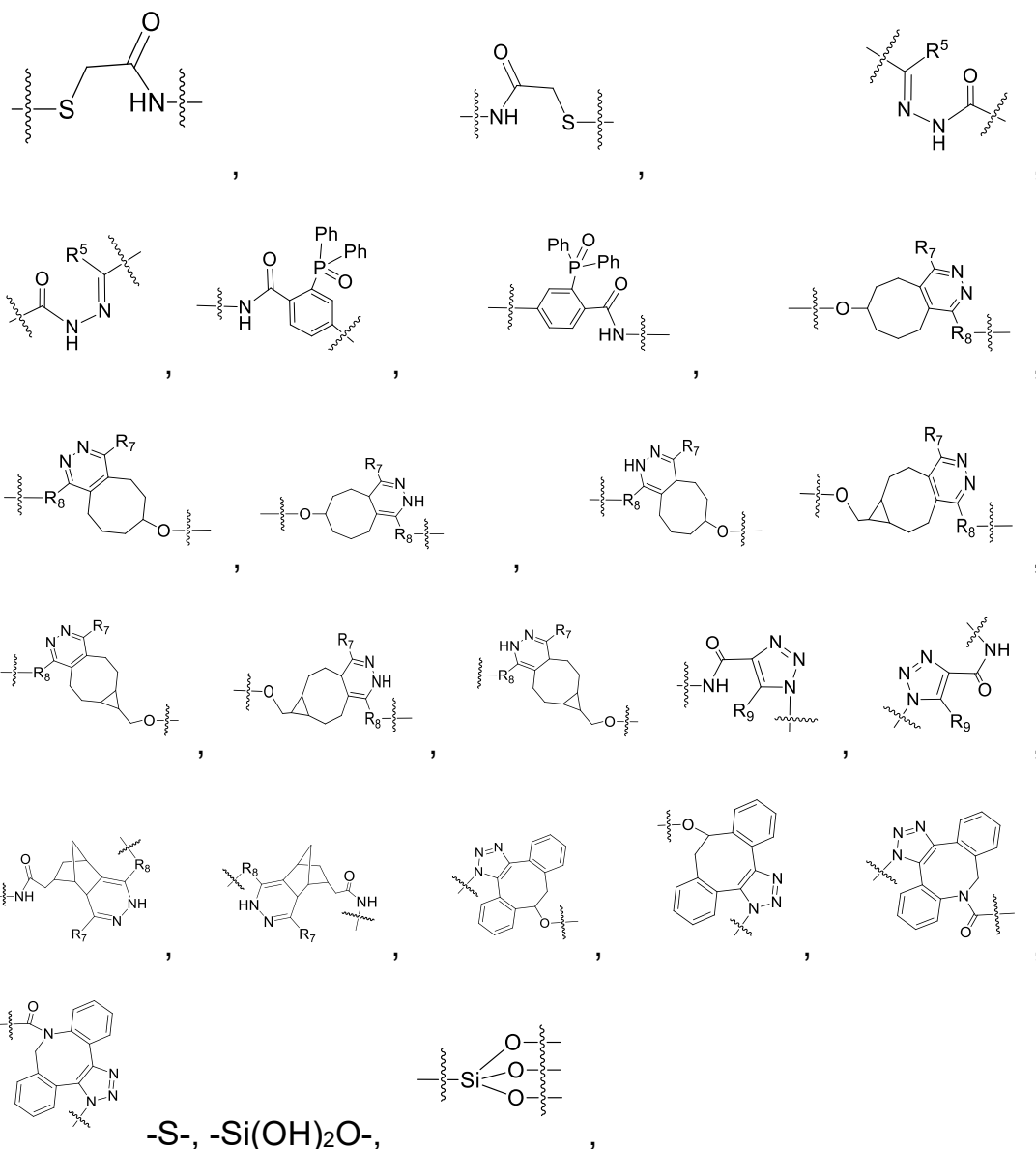
[00225] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$; onde:

A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, ou $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[00226] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,





-CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

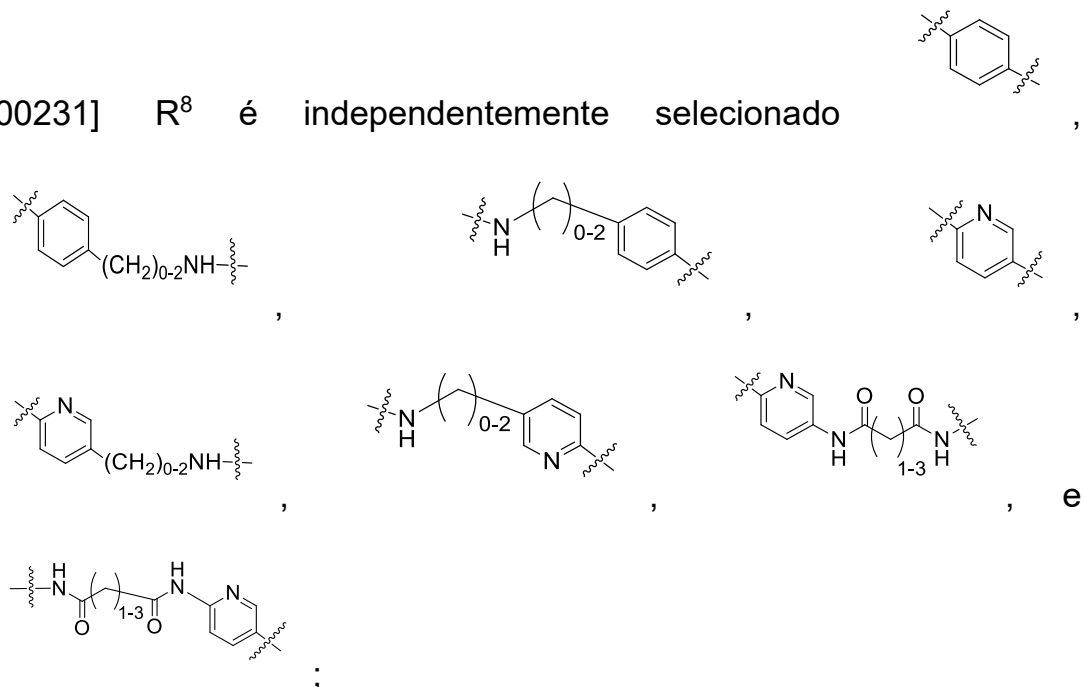
[00227] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

[00228] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituído por 1 a 3 grupos -OH;

[00229] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituído por -C(=O)OH, C₁₋₄ alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄alquila substituído por -C(=O)OH;

[00230] R^7 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00231] R^8 é independentemente selecionado



[00232] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00233] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

[00234] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9;

[00235] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00236] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

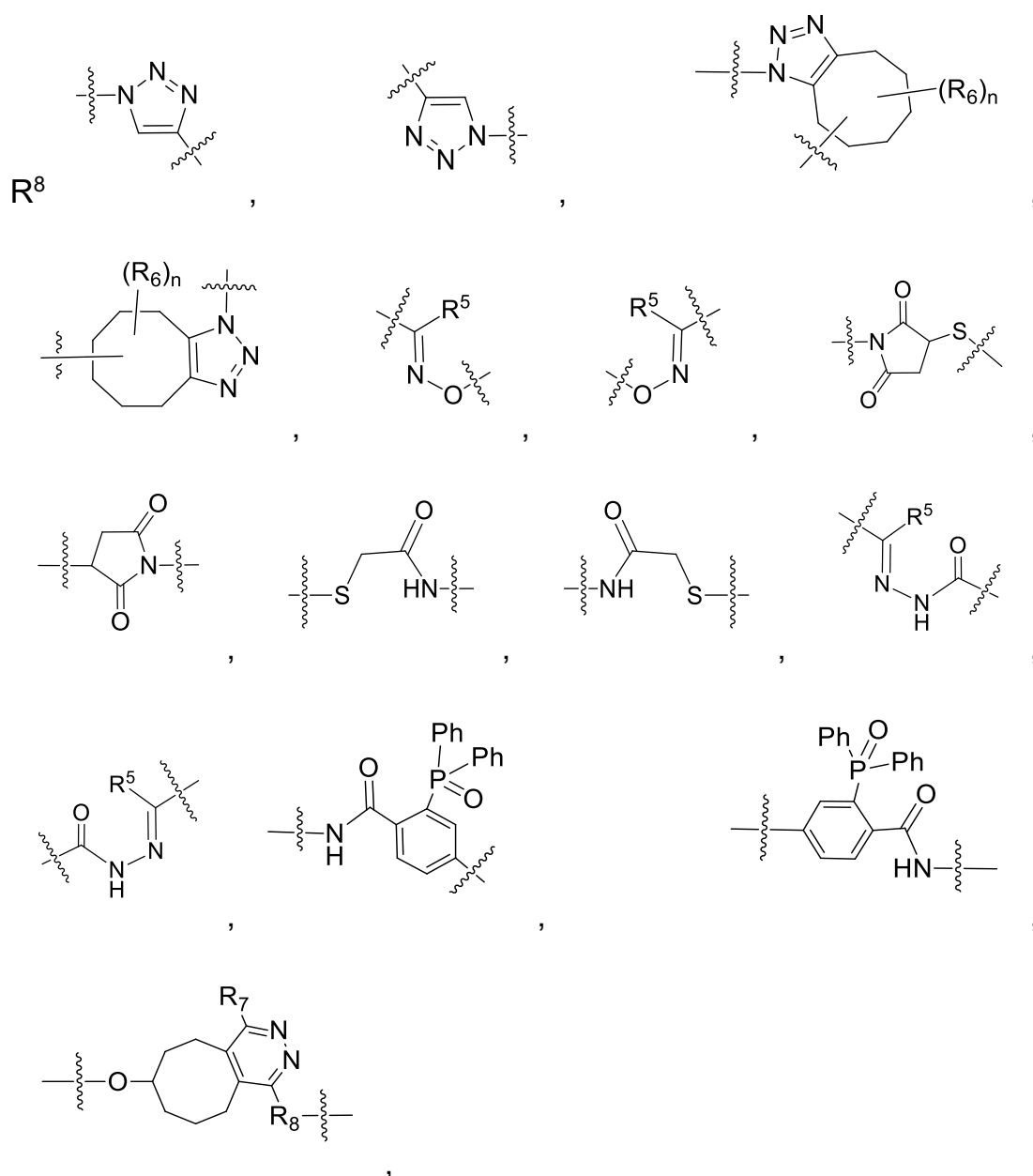
[00237] L_4 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

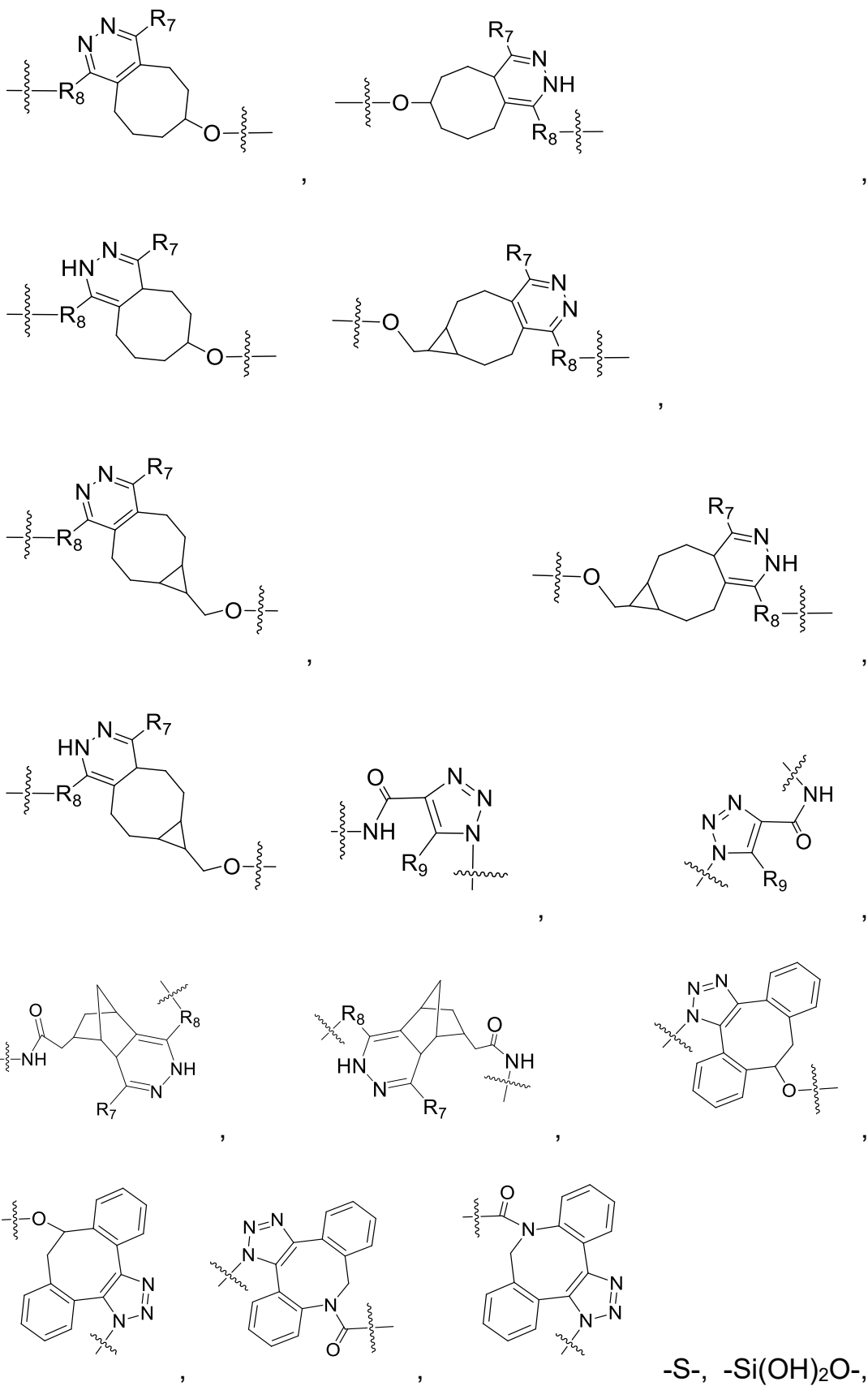
[00238] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

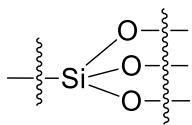
[00239] L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$; onde:

A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ ou $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[00240] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,







, $-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ e $-\text{NHC}(=\text{O})-$;

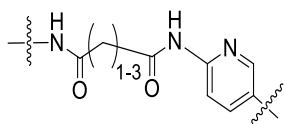
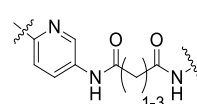
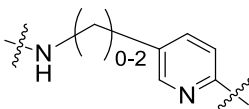
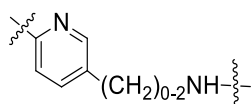
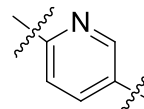
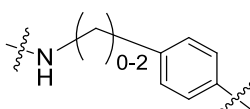
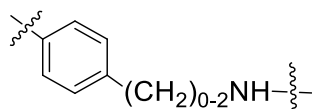
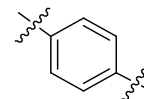
[00241] cada R^4 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ e $-\text{OH}$,

[00242] cada R^5 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila ou C_{1-4} alquila substituída por 1 a 3 grupos $-\text{OH}$;

[00243] cada R^6 é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, benzila substituído por $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_{1-4} alcóxi substituído por $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ e C_{1-4} alquila substituído por $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

[00244] R^7 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00245] R^8 é independentemente selecionado



[00246] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00247] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8 e 9, e

[00248] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9;

[00249] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável;

[00250] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável ou um ligante fotoclivável, e

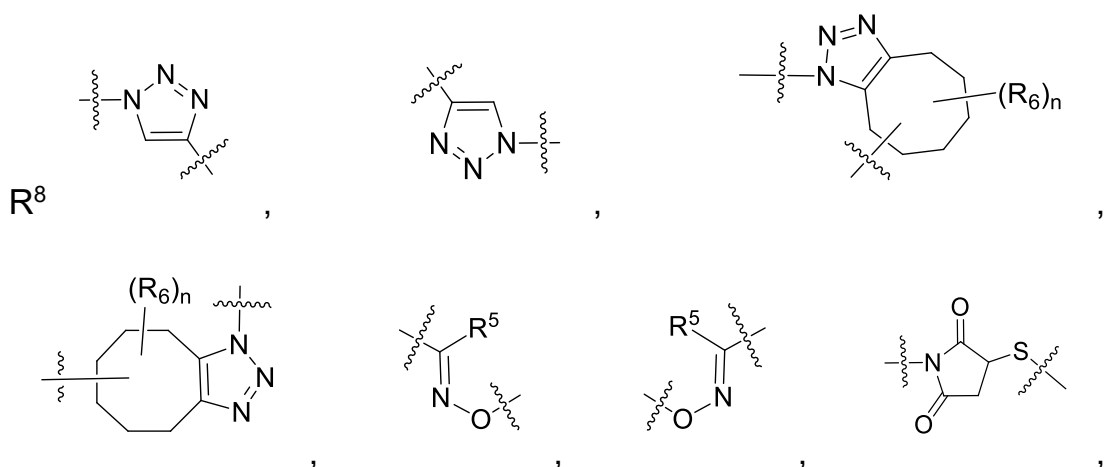
[00251] L_4 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável, um ligante não clivável, um ligante enzimaticamente clivável, um ligante fotoestável, um ligante fotoclivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

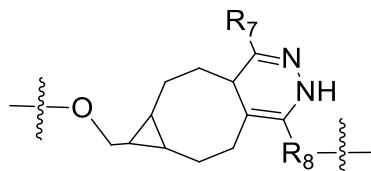
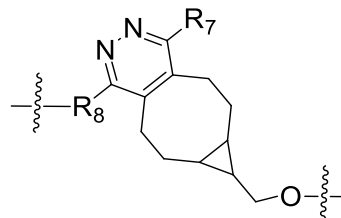
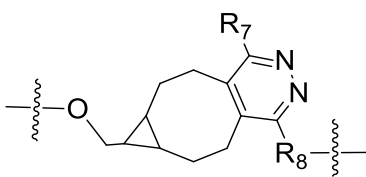
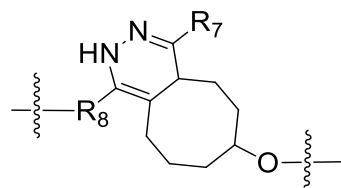
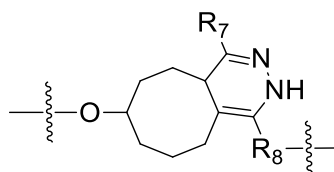
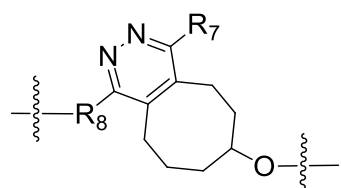
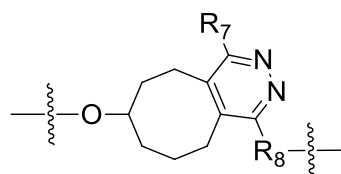
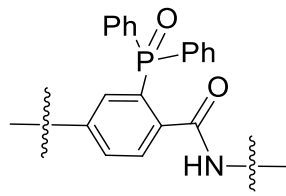
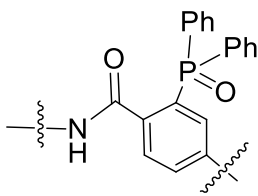
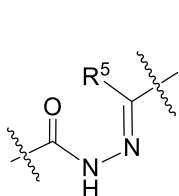
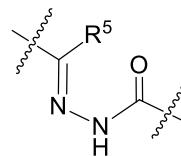
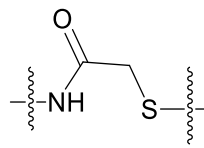
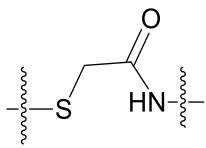
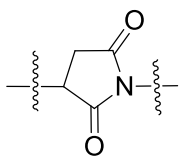
[00252] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

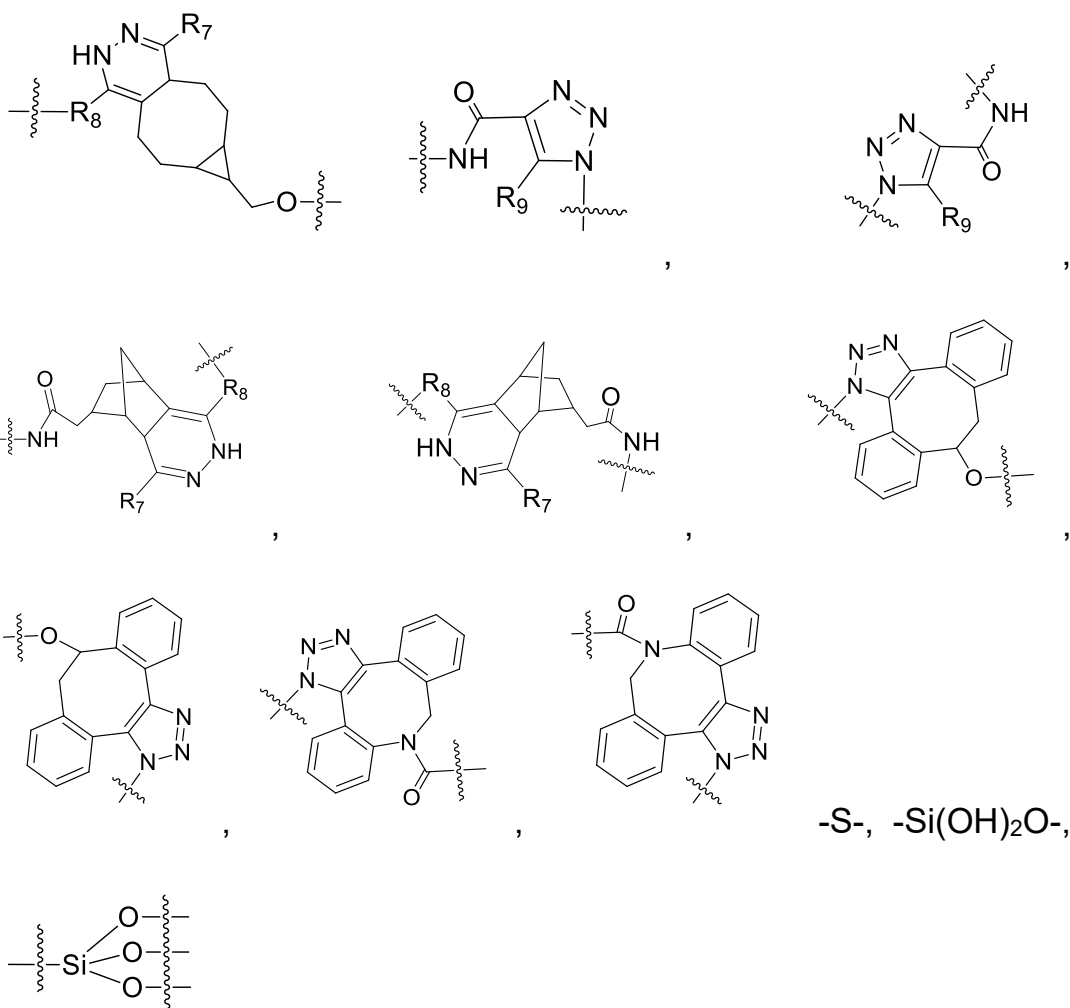
[00253] L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$; onde:

A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ or $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[00254] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,







, -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

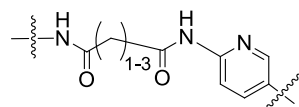
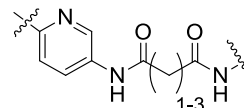
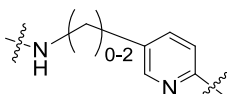
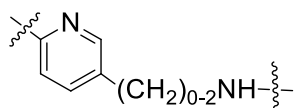
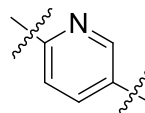
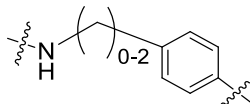
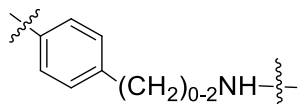
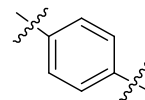
[00255] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

[00256] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituída por 1 a 3 grupos -OH;

[00257] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C₁₋₄ alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄alquila substituído por -C(=O)OH;

[00258] R⁷ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila, pirimidina e pirdina;

[00259] R^8 é independentemente selecionado de



e

[00260] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00261] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9;

[00262] L_2 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável ou um ligante não clivável;

[00263] L_3 é uma ligação, um ligante não enzimaticamente clivável ou um ligante não clivável;

[00264] L_4 é uma ligação, um ligante enzimaticamente clivável ou um ligante que compreende um espaçador autoimolativo.

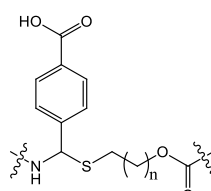
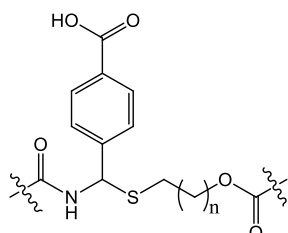
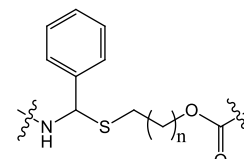
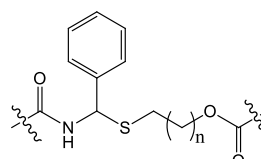
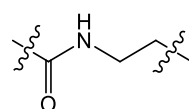
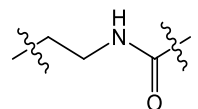
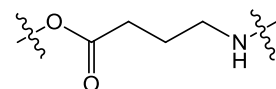
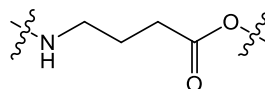
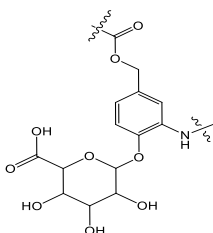
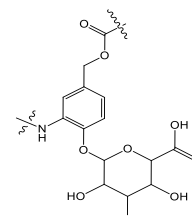
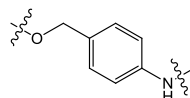
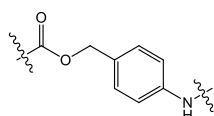
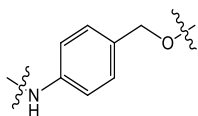
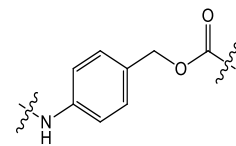
[00265] Em certas modalidades a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

[00266] L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$;

[00267] L_2 é uma ligação, $-A_2-$, ou $-A_2X^2-$;

[00268] L_3 é uma ligação, $-A_3-$, ou $-A_3X^2-$;

[00269] L₄ é uma ligação, -A₄-, -A₄X²-,

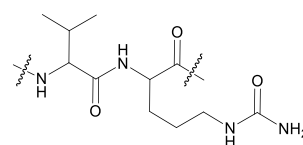


, ou ;

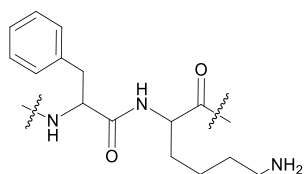
A₁ é -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -
(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH-, -
(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -
NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -
C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -
C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -
C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
-(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -

$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, ou -
 $(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$;

A_2 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_{n-}$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(O(CH_2)_n)_{m-}$, -
 $(O(C(R^4)_2)_n)_{m-}$, $-((CH_2)_nO)_{m-}$, $-((C(R^4)_2)_nO)_{m-}$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n-}$, -
 $((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NR^4-$, -
 $(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -
 $NHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, -
 $S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nS-$, $-(C(R^4)_2)_nS-$, -
 $S(CH_2)_n-$, $-S(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nNH-$, $-(C(R^4)_2)_nNH-$, -
 $C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -
 $C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, $-C(=O)(CH_2)_{n-}$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$,
 $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, -
 $(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n-}$, -
 $(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -



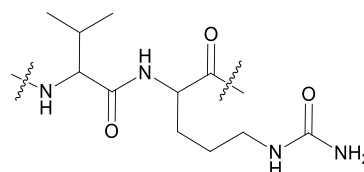
$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$,



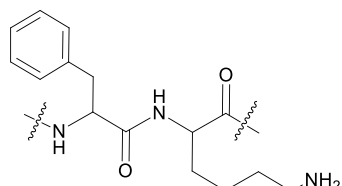
ou;

A_3 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_{n-}$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(O(CH_2)_n)_{m-}$, -
 $(O(C(R^4)_2)_n)_{m-}$, $-((CH_2)_nO)_{m-}$, $-((C(R^4)_2)_nO)_{m-}$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_{n-}$, -
 $((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, -
 $(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_{n-}$, -

$\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-\text{C(=O)NH(CH}_2)_n\text{S-}$, $-\text{C(=O)NH(C(R}^4)_2)_n\text{S-}$, $-$
 $\text{S(CH}_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-\text{S(C(R}^4)_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{S-}$, $-(\text{C(R}^4)_2)_n\text{S-}$, $-$
 $\text{S(CH}_2)_n^-$, $-\text{S(C(R}^4)_2)_n^-$, $-\text{C(=O)NH(CH}_2)_n\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $\text{C(=O)NH(C(R}^4)_2)_n\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-\text{C(=O)(CH}_2)_n^-$, $-\text{C(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$,
 $-(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)-}$, $-(\text{C(R}^4)_2)_n\text{C(=O)-}$, $-(\text{CH}_2)_n(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$,
 $(\text{CH}_2)_n(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{OC(=O)NH(CH}_2)_n^-$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{OC(=O)NH(C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{CH}_2)_n(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{OC(=O)-}$,
 $-(\text{C(R}^4)_2)_n(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{OC(=O)-}$, $-(\text{CH}_2)_n(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{C(=O)-}$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{C(=O)-}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$



$(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$,

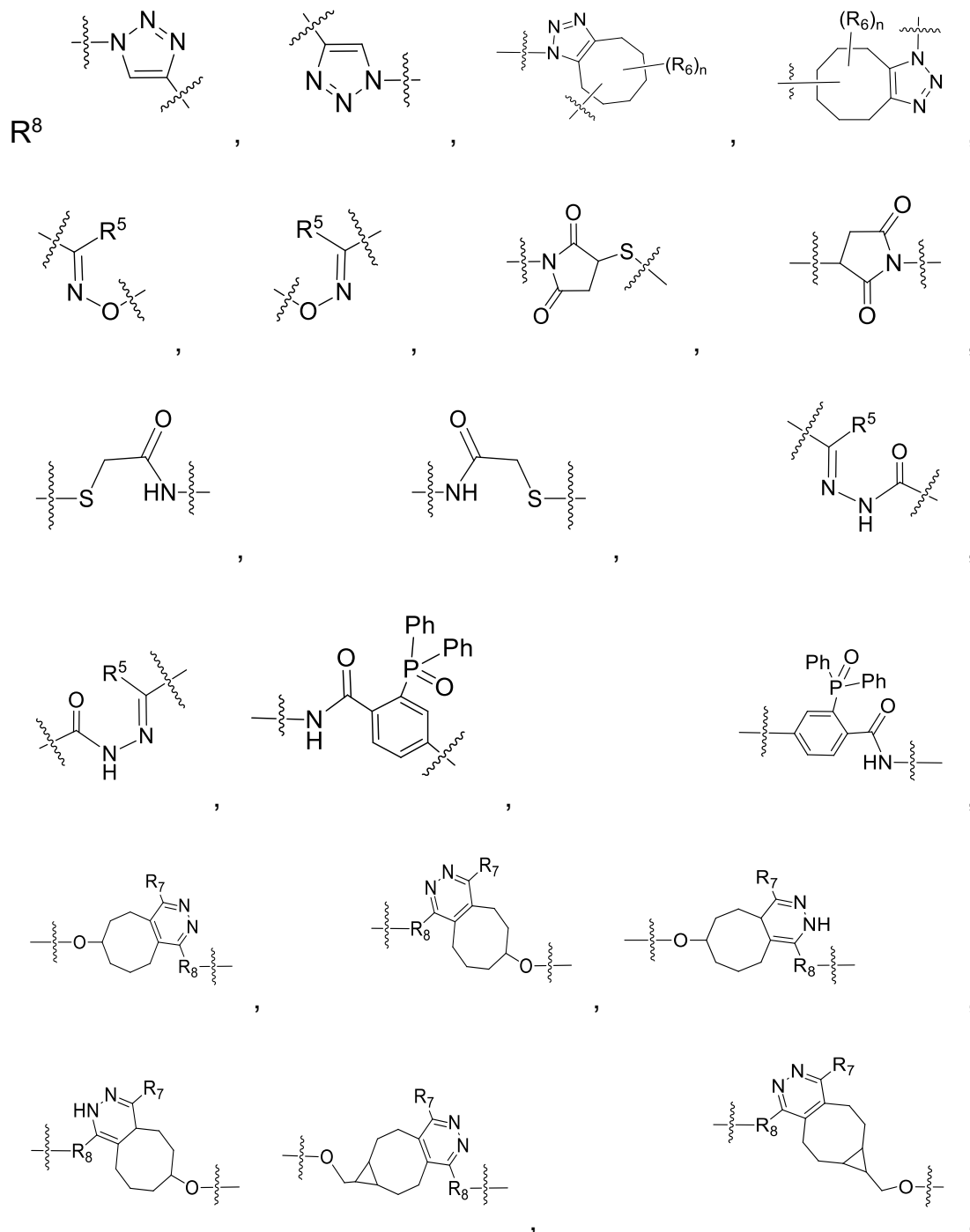


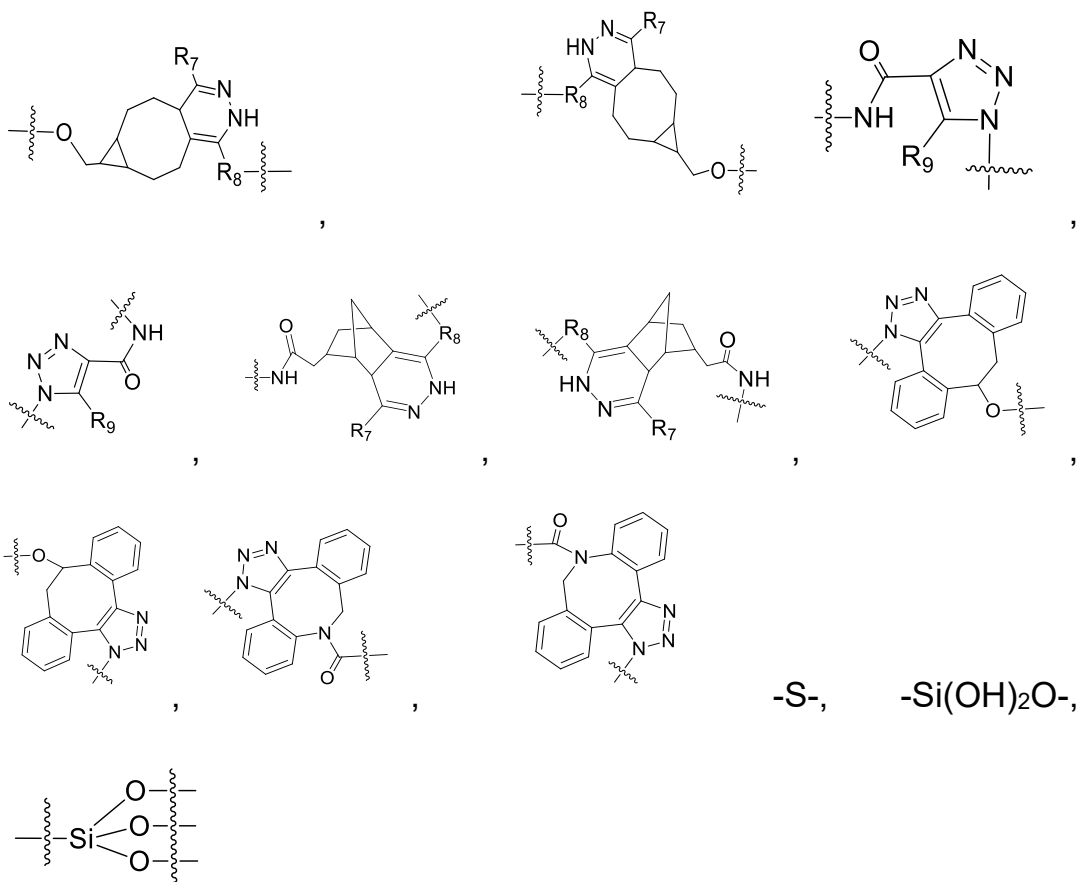
ou

A_4 é $-\text{C(=O)NH-}$, $-\text{C(=O)NH(CH}_2)_n^-$, $-\text{C(=O)NH(C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{O(CH}_2)_n)_m^-$, $-$
 $(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m^-$, $-((\text{CH}_2)_n\text{O})_m^-$, $-((\text{C(R}^4)_2)_n\text{O})_m^-$, $-((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n^-$, $-$
 $((\text{C(R}^4)_2)_n\text{O})_m\text{C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-(\text{C(R}^4)_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-$
 $(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)-}$, $-(\text{C(R}^4)_2)_n\text{NHC(=O)-}$, $-\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-\text{C(=O)NH(CH}_2)_n\text{S-}$, $-\text{C(=O)NH(C(R}^4)_2)_n\text{S-}$, $-$
 $\text{S(CH}_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-\text{S(C(R}^4)_2)_n\text{C(=O)NH-}$, $-$
 $\text{C(=O)NH(CH}_2)_n\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $\text{C(=O)NH(C(R}^4)_2)_n\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-\text{C(=O)(CH}_2)_n^-$, $-\text{C(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$,
 $-(\text{CH}_2)_n\text{C(=O)-}$, $-(\text{C(R}^4)_2)_n\text{C(=O)-}$, $-(\text{CH}_2)_n(\text{O(CH}_2)_n)_m\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n(\text{O(C(R}^4)_2)_n)_m\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC(=O)(CH}_2)_n^-$, $-$
 $(\text{C(R}^4)_2)_n\text{NHC(=O)(C(R}^4)_2)_n^-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n^-$, $-$

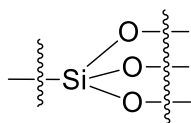
$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_{n-}$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, ou $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_{n-}$;

[00270] cada X^2 é independentemente selecionado de uma ligação,





-S-, -Si(OH)₂O-,



, -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -

C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

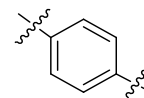
[00271] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

[00272] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituído por 1 a 3 grupos -OH;

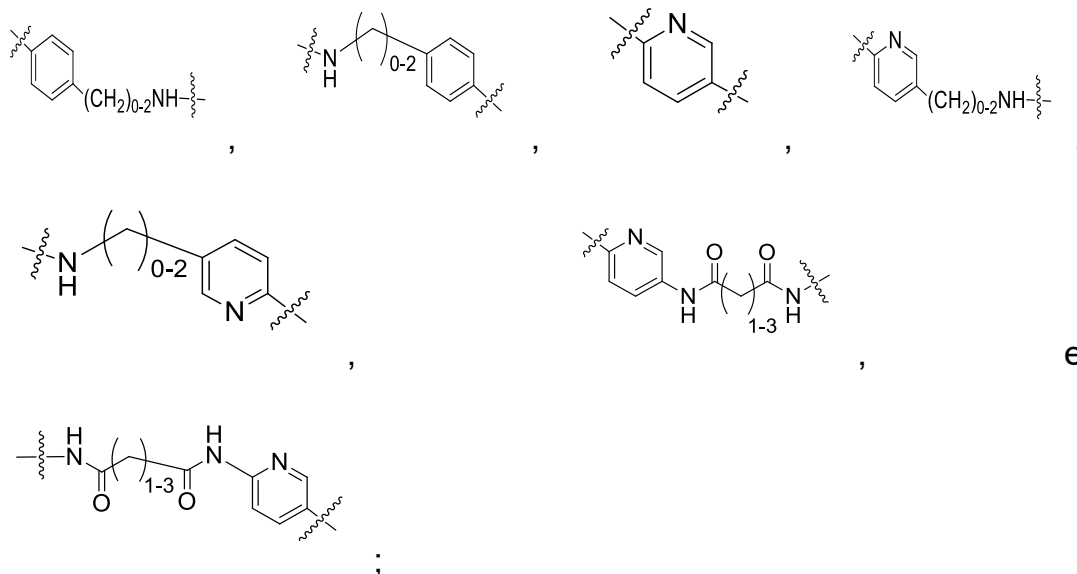
[00273] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C₁₋₄ alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄ alquila substituído por -C(=O)OH;

[00274] R⁷ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00275] R⁸ é independentemente selecionado de



,



[00276] R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;

[00277] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e

cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

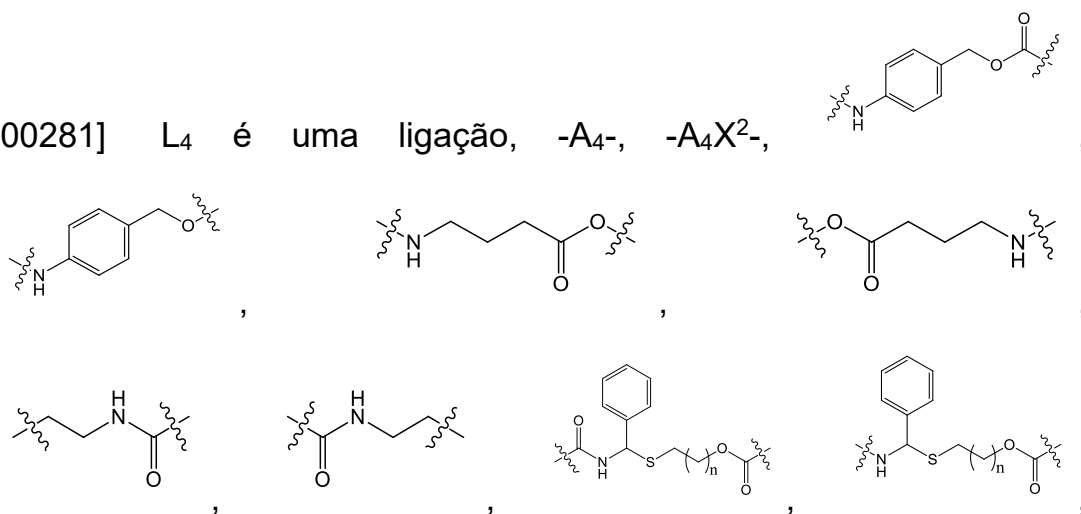
[00278] Em certas modalidades a Unidade Ligantea (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, onde

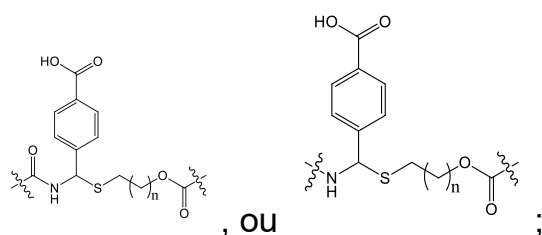
[00279] L_1 é uma ligação, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ ou $-X^2-$;

[00280] L_2 é uma ligação, $-A_2-$, ou $-A_2X^2-$;

L_3 é uma ligação, $-A_3-$, ou $-A_3X^2-$;

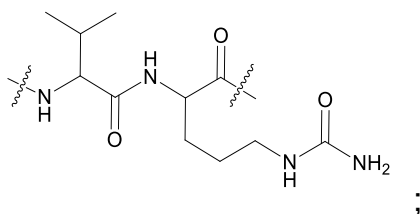
[00281] L_4 é uma ligação, $-A_4-$, $-A_4X^2-$,



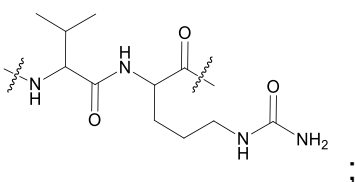


A₁ é -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- ou -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

A₂ é -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n- ou

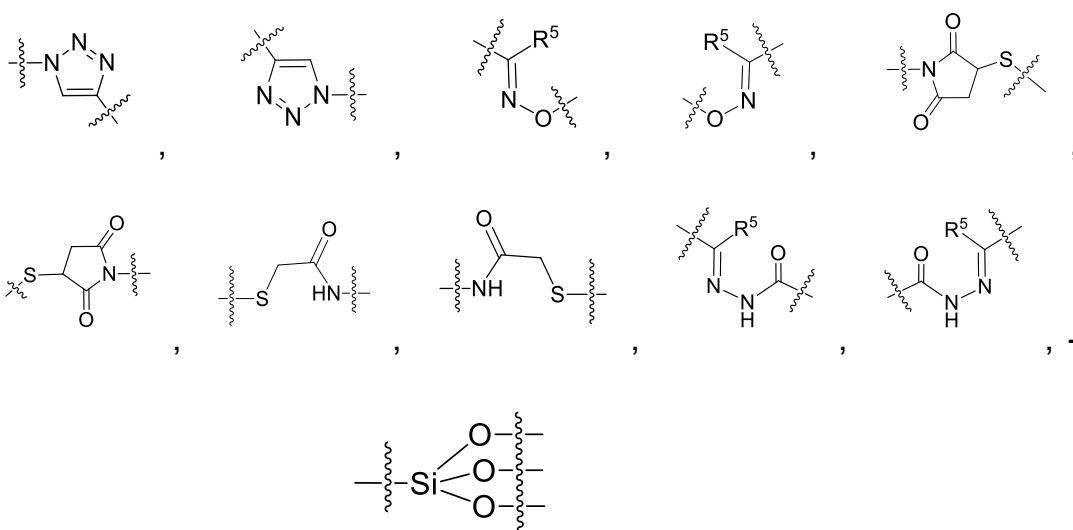


A₃ é -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n- ou



A₄ -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- ou -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

[00282] cada X² é independentemente selecionado de uma ligação,



S-, -Si(OH)₂O-, , -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -
 CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

[00283] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄
 alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

[00284] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄
 alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituído por 1 a 3 grupos -OH;

[00285] cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6,
 7, 8 e 9, and

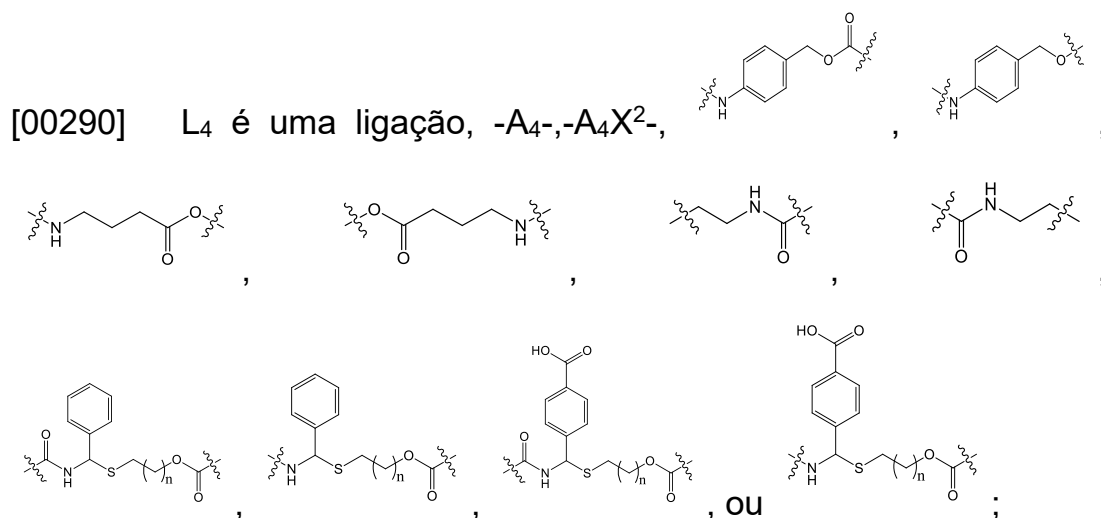
[00286] cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5,
 6, 7, 8 e 9.

[00287] Em certas modalidades a Unidade Ligantea (LU) é -L₁-L₂-
 L₃-L₄-, onde

[00288] L₁ é uma ligação, -A₁-, -A₁X²- ou -X²-;

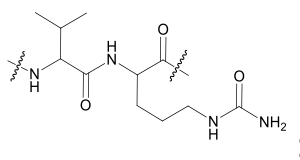
[00289] L₂ é uma ligação, -A₂-, ou -A₂X²-;

L_3 é uma ligação, $-A_3-$, ou $-A_3X^2-$;



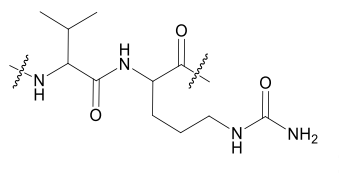
A_1 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ ou $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

A_2 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ ou



$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ ou

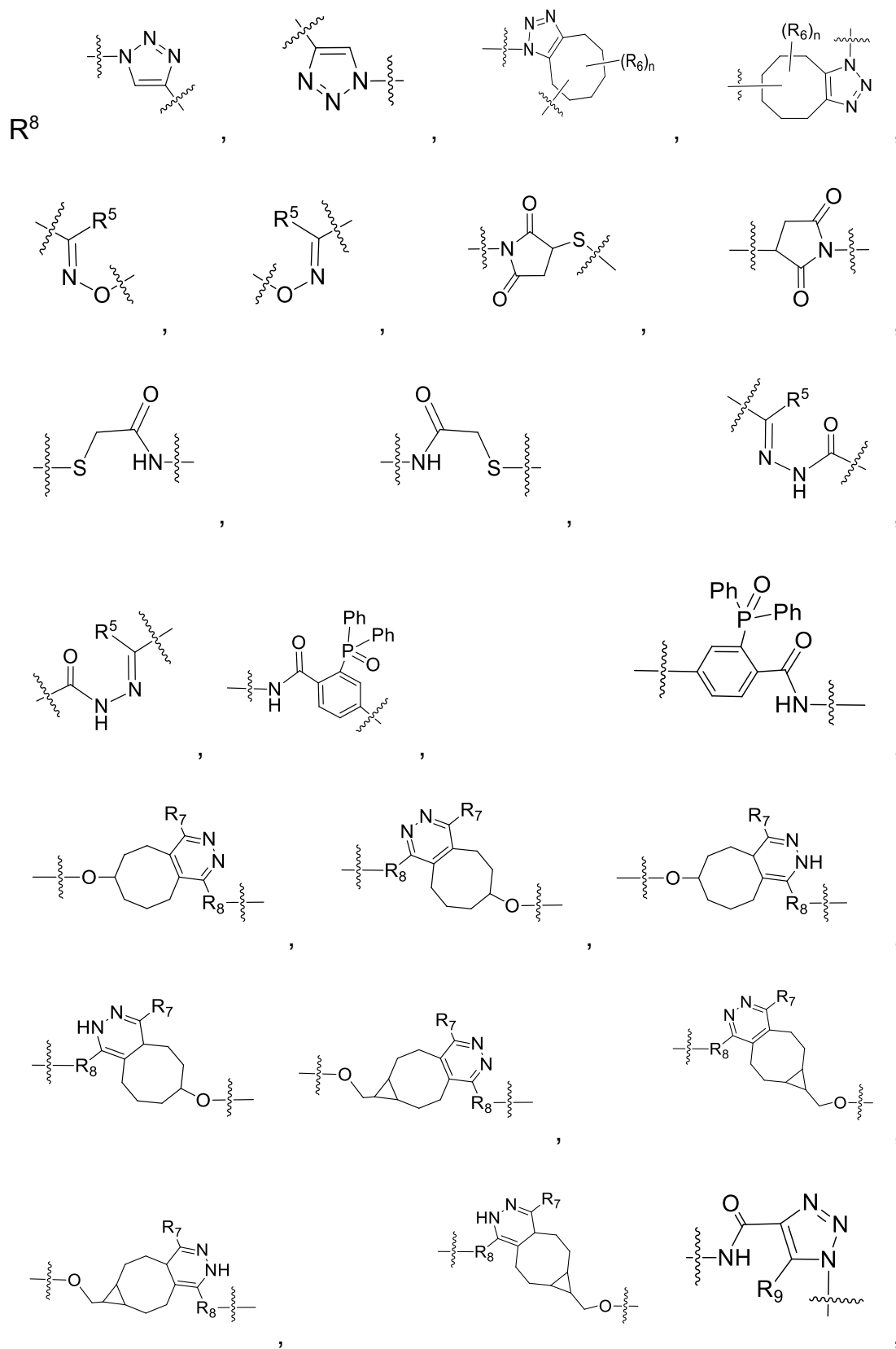
A_3 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ ou

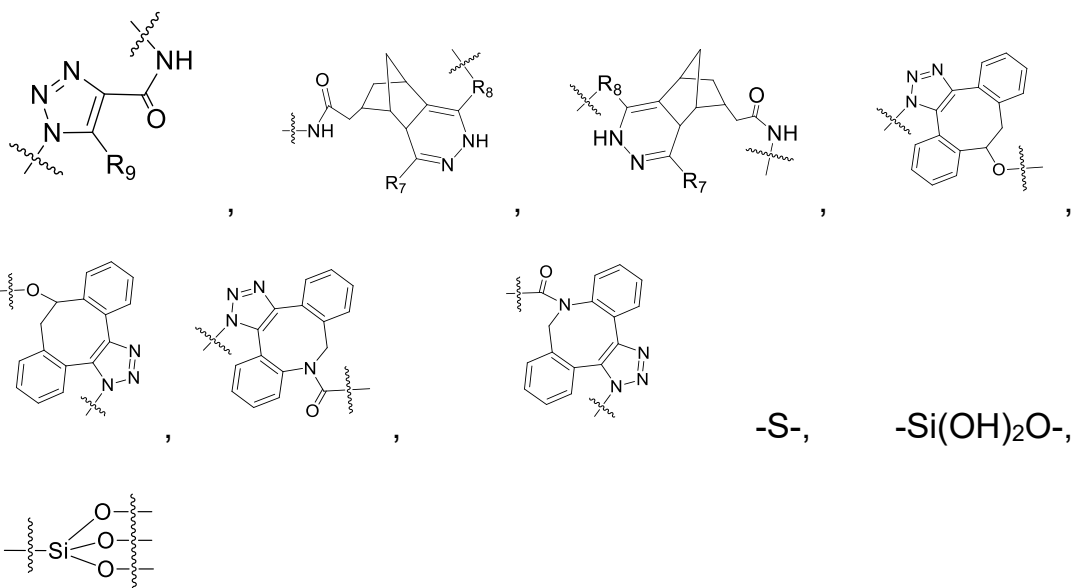


$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ ou

A_4 é $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ ou $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[00291] cada X² é independentemente selecionado de uma ligação,





, -S-, -Si(OH)₂O-,
 , -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 C(=O)NH- e -NHC(=O)-;

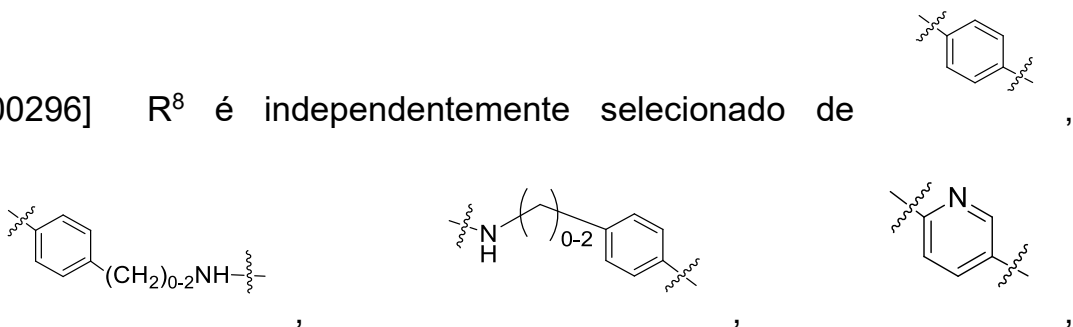
[00292] cada R⁴ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, cadeias laterais de aminoácidos conhecidos, -C(=O)OH e -OH,

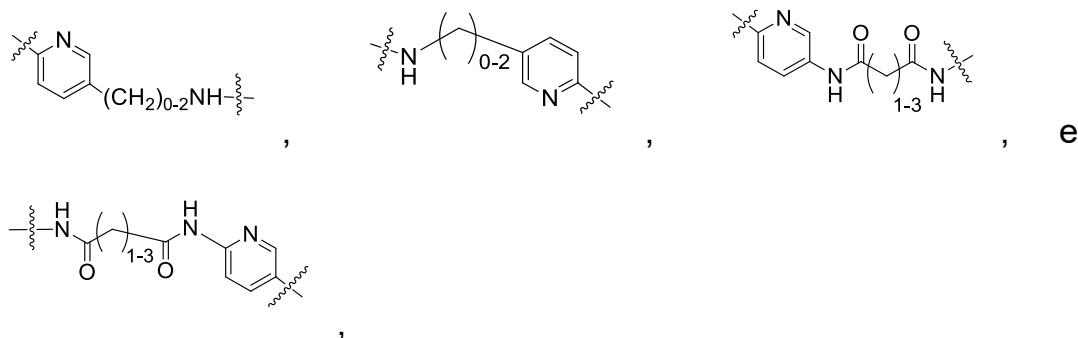
[00293] cada R⁵ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila ou C₁₋₄ alquila substituída por 1 a 3 grupos -OH;

[00294] cada R⁶ é independentemente selecionado de H, flúor, benzilóxi substituído por -C(=O)OH, benzila substituída por -C(=O)OH, C₁₋₄ alcóxi substituído por -C(=O)OH e C₁₋₄ alquila substituída por -C(=O)OH;

[00295] R⁷ é independentemente selecionado de H, C₁₋₄ alquila, fenila, pirimidina e piridina;

[00296] R⁸ é independentemente selecionado de

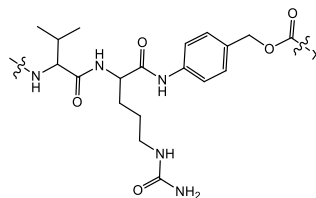




R^9 é independentemente selecionado de H e C_{1-6} haloalquila;
 cada n é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e
 cada m é independentemente selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

[00297] Em uma modalidade, L_1 é $-(CH_2)_{1-10}-C(=O)-$, por exemplo, $-(CH_2)_5-C(=O)-$; e L_2 , L_3 e L_4 cada representa uma ligação.

[00298] Em certas modalidades LU compreende um ligante val-cit desta fórmula, em que X representa a carga útil, tipicamente uma porção de fármaco tal como aquela tendo atividade anticâncer:



[00299] Quando $L_4-L_5-L_6$ é um ligante val-cit como mostrado acima, L_3 é preferivelmente $-(CH_2)_{2-6}-C(=O)-$.

[00300] Em certas modalidades, o grupo X é um maitansinoide, tal como DM1 ou DM4, ou um análogo de dolastatina a ou derivado, tal como dolastatina 10 ou 15 e auriestatinas MMAF ou MMAE, ou a caliqueamicina tal como N-acetil- γ -caliqueamicina, ou um rótulo ou pigmento tal como rodamina ou tetrametilrodamina.

[00301] Como usado aqui, um "ligante" é qualquer porção química que é capaz de conectar um anticorpo ou um fragmento do mesmo a um grupo X (carga útil) para formar um imunoc conjugado. Ligantes podem ser suscetíveis à clivagem, tais como, clivagem induzida por ácido, clivagem induzida por luz, clivagem induzida por peptidase,

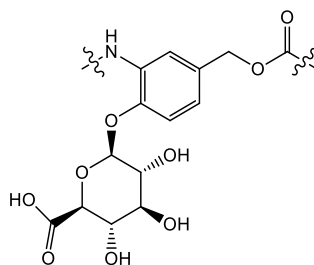
clivagem induzida por esterase, clivagem por ligação de dissulfeto, em condições sob as quais o composto ou o anticorpo permanece ativo. Alternativamente, ligantes podem ser substancialmente resistentes à clivagem. Um ligante pode ou não incluir um espaçador autoimolativo.

[00302] Exemplos não limitantes dos ligantes não enzimaticamente cliváveis como usado aqui para conjugar um grupo X¹ aos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecidos aqui incluem, ligantes lábeis ao ácido, ligantes contendo uma porção de dissulfeto, ligantes contendo uma porção de triazol, ligantes contendo uma porção de hidrazona, ligantes contendo uma porção de tioéter, ligantes contendo uma porção de diazo, ligantes contendo uma porção de oxima, ligantes contendo uma porção de amida e ligantes contendo uma porção de acetamida.

[00303] Exemplos não limitantes dos ligantes enzimaticamente cliváveis, como usado aqui, para conjugar um grupo X aos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecido aqui incluem, porém não estão limitados a, ligantes que são clivados por uma protease, ligantes que são clivados por uma amidase, e ligantes que são clivados por β -glucuronidase ou outra glicosidase.

[00304] Em certas modalidades, tais ligantes cliváveis por enzima são ligantes que são clivados por catepsina, incluindo catepsina Z, catepsina B, catepsina H e catepsina C. Em certas modalidades o ligante enzimaticamente clivável é um dipeptídeo clivado por catepsina, incluindo dipeptídeos clivado por catepsina Z, catepsina B, catepsina H ou catepsina C. Em certas modalidades o ligante enzimaticamente clivável é um ligante de peptídeo clivável por catepsina B. Em certas modalidades o ligante enzimaticamente clivável é um ligante de dipeptídeo clivável por catepsina B. Em certas modalidades o ligante de dipeptídeo enzimaticamente clivável é valina-citrulina ou fenilalanina-lisina. Outros exemplos não limitantes dos

ligantes enzimaticamente cliváveis como usado aqui conjugam um grupo X aos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecidos aqui incluem, porém não estão limitados a, ligantes que são clivados por β -glucuronidase, por exemplo,



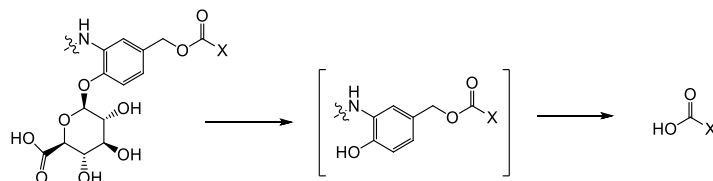
Veja Ducry *et al*, *Bioconjugate Chem*, (2010) vol. 21(1), 5-13.

[00305] “Espaçadores autoimolativos” são porções químicas bifuncionais covalentemente ligadas em uma terminação a uma primeira porção química e na outra terminação a uma segunda porção química, desse modo formando uma molécula de tripartato estável. Um ligante pode compreender um espaçador autoimolativo ligado a uma terceira porção química que é clivável do espaçador ou quimicamente ou enzimaticamente. Em clivagem de uma ligação entre o espaçador autoimolativo e a primeira porção química ou a terceira porção química, espaçadores autoimolativos sofrem reações intramoleculares rápidas e espontâneas e desse modo separam-se da segunda porção química. Estas reações intramoleculares geralmente envolvem reorganizações eletrônicas tais como 1,4, ou 1,6, ou 1,8 reações de eliminação ou ciclizações para formar anéis de cinco ou seis membros altamente favorecidos. Em certas modalidades da presente invenção, a primeira ou terceira porção é um grupo clivável por enzima, e esta clivagem resulta de uma reação enzimática, enquanto que em outras modalidades a primeira ou terceira porção é um grupo lábil ao ácido e esta clivagem ocorre devido a uma mudança em pH. Como aplicado à presente invenção, a segunda porção é um grupo de “Carga útil” como definido aqui. Em certas modalidades, a

clivagem da primeira ou terceira porção do espaçador autoimolativo resulta de clivagem por uma enzima proteolítica, enquanto que em outras modalidades, resulta de clivagem por uma hidrolase. Em certas modalidades, a clivagem da primeira ou terceira porção do espaçador autoimolativo resulta de clivagem por uma enzima catepsina ou um glucuronidase.

[00306] Em certas modalidades, o ligante clivável por enzima é um ligante de peptídeo e o espaçador autoimolativo é covalentemente ligado em uma de suas extremidades ao ligante de peptídeo e covalentemente ligado em sua outra extremidade a uma porção de fármaco. Esta molécula de tripartita é estável e farmallogicamente inativa na ausência de uma enzima, porém que é enzimaticamente clivável por enzima em uma ligação covalentemente ligando a porção espaçadora e a porção de peptídeo. A porção de peptídeo é clivada da molécula de tripartato que inicia o caráter de autoimolação da porção espaçadora, resultando em clivagem espontânea da ligação covalentemente ligando a porção espaçadora à porção de fármaco, para desse modo realizar a liberação do fármaco em forma farmacologicamente ativa.

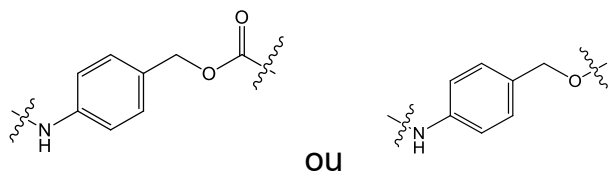
[00307] Em outras modalidades, um ligante compreende um espaçador autoimolativo que se conecta ao peptídeo, ou diretamente ou indiretamente a uma extremidade, e a uma carga útil na outra extremidade; e o espaçador é ligado a uma terceira porção que pode ser clivada do espaçador enzimaticamente, tal como por uma glucuronidase. Na clivagem da terceira porção, o espaçador degrada-se ou reorganiza-se de um modo que faça com que a carga útil seja liberada. Um exemplo de um ligante com este tipo de espaçador autoimolativo é este ligante clivável por glucuronidase, onde a hidrólise do acetal catalizado por glucoronidase libera um composto fenólico que espontaneamente decompõe-se sob condições fisiológicas:



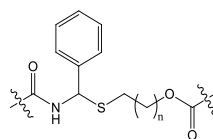
[00308] Exemplos não limitantes do espaçador autoimolativo opcionalmente usado na conjugação de um grupo X¹ aos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecidos aqui incluem, porém não estão limitados a, porções que incluem uma porção benzil carbonila, uma porção de benzil éter, uma porção de 4-aminobutirato, uma porção hemitioaminal ou uma porção N-acilhemitioaminal.

[00309] Outros exemplos de espaçadores autoimolativos incluem, porém não estão limitados a, grupos p-aminobenziloxycarbonila, compostos aromáticos que são eletronicamente similares ao grupo p-aminobenziloxycarbonila, tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol e orto ou para-aminobenzilacetais. Em certas modalidades, espaçadores autoimolativos usados aqui que sofrem ciclização em hidrólise de ligação de amida, incluem amidas de ácido 4-aminobutírico substituídas e não substituídas e amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico.

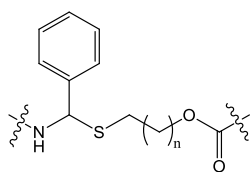
[00310] Em certas modalidades, o espaçador autoimolativo é



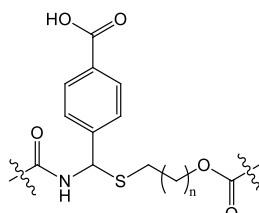
, enquanto que em outras



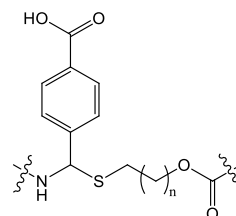
modalidades o espaçador autoimolativo é , onde n é 1 ou 2. Em outras modalidades o espaçador autoimolativo é



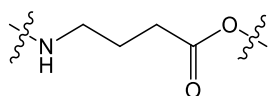
, onde n é 1 ou 2. Em outras modalidades o



espaçador autoimolativo é , onde n é 1 ou 2. Em



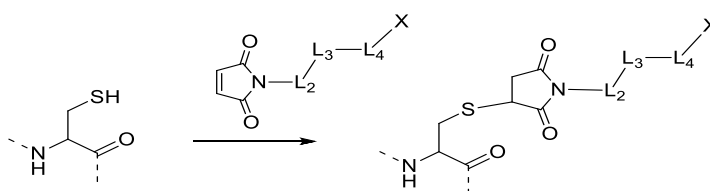
outras modalidades o espaçador autoimolativo é , onde n é 1 ou 2. Em outras modalidades o espaçador autoimolativo é



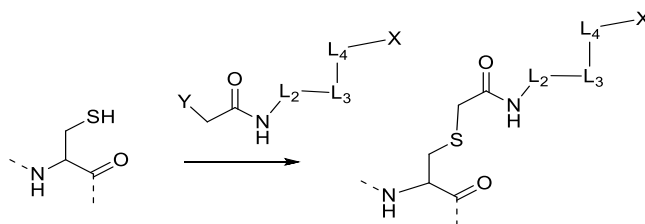
, onde n é 1 ou 2.

[00311] Esquemas (2a-2c) ilustram a modificação pós-translacional dos anticorpos modificados ou fragmento de anticorpo dos mesmos fornecidos aqui em que a Unidade Ligante (LU) é $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, e L_1 em cada caso é o grupo que reage com a nov Cys.

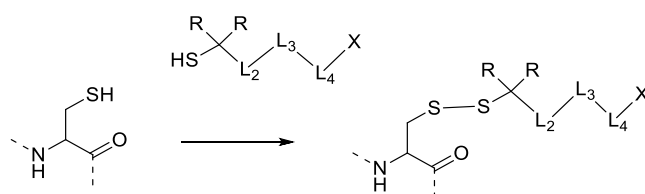
Esquema2a.



Esquema 2b.



Esquema 3c.



[00312] Em cada dos esquemas 2a-2c, o material de partida é o resíduo Cys de substituição em um anticorpo ou fragmento de anticorpo modificado como descrito aqui, onde as linhas tracejadas indicam a conexão a resíduos adjacentes do anticorpo ou fragmento de anticorpo; cada R é H ou C₁₋₄ alquila, tipicamente H ou metila; L₂, L₃ e L₄ são componentes da unidade de ligação LU, tal como aqueles descritos acima; X é a carga útil; e o grupo que conecta L₂ ao enxofre do substituto de Cys da invenção é L₁.

[00313] Em algumas modalidades da invenção, X é um grupo funcional reativo que pode ser usado para conectar o anticorpo conjugado à outra porção química, interagindo com um grupo funcional complementar adequado. A tabela 4 representa alguns exemplos de grupos funcionais reativos que X pode representar, juntamente com um grupo funcional complementar que pode ser usado para conectar um conjugado compreendendo X a outro composto. Métodos de uso de X para conectar-se ao grupo funcional complementar correspondente são bem conhecidos na técnica. Conexões usando azida são tipicamente feitas usando química 'Clique' ou clique livre de cobre; reações envolvendo hidrazinas, alcoxiâminas ou acil hidrazinas tipicamente prosseguidas por meio da formação de uma base Schiff

com um dos grupos funcionais de carbonila.

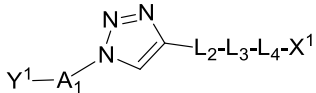
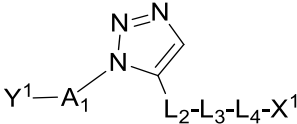
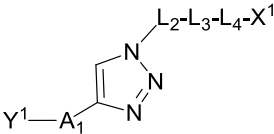
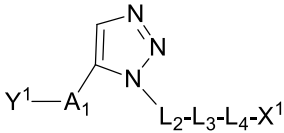
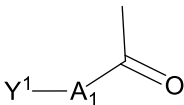
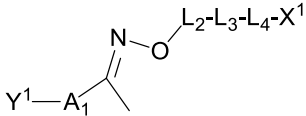
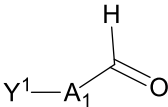
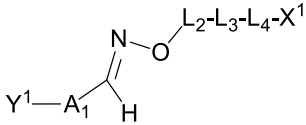
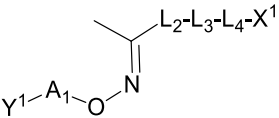
Tabela 4

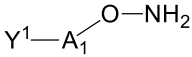
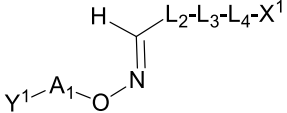
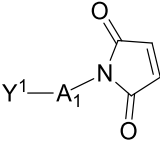
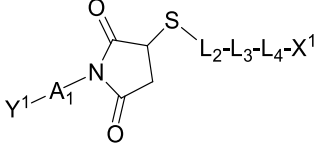
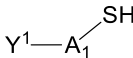
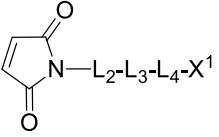
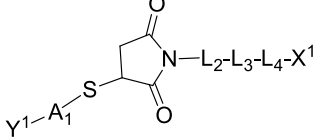
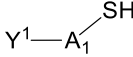
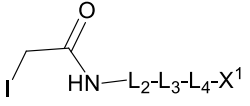
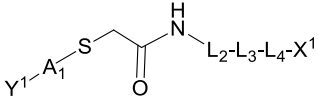
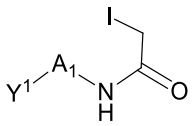
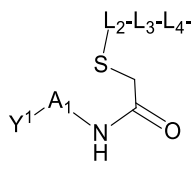
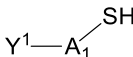
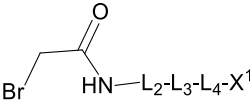
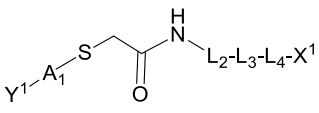
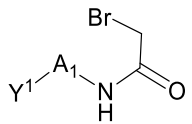
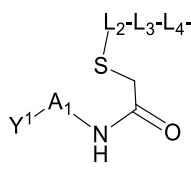
X	Grupo Funcional Reativo Complementar para X
atíol	atíol, uma maleimida, uma haloacetamida, uma vinilsulfona, ou uma vinilpiridina
anazide	um alceno, alquina, uma fosfina-(tio)éster, uma ciclooctina, uma cicloocteno ou um oxanobornadieno
aphosphine-(thio)ester)	uma azida
anoxanobornadiene	uma azida ou uma tetrazina
analkyne	uma azida ou uma tetrazina
analkene	uma tetrazina
aciclooctyne	uma azida ou uma tetrazina
aciclooctene	uma tetrazina
anorbornene	uma tetrazina
uma tetrazina	um norborneno, um alceno, uma alquina, uma ciclooctina ou um oxanobornadieno
analdehyde	uma hidroxilamina, uma hidrazina ou $\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$
aketone	uma hidroxilamina, uma hidrazina ou $\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$
uma hidroxilamina	um aldeído ou uma cetona
ahydrazine	um aldeído ou uma cetona
$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$	um aldeído ou uma cetona
ahaloacetamida	um tíol
um tíol	um tíol
amaleimida	um tíol
avinilsulfona	um tíol
avinilpiridina	um tíol

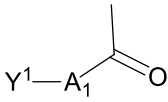
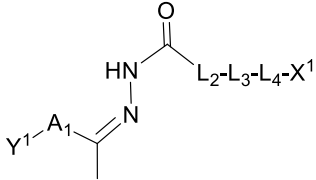
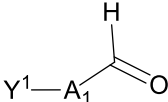
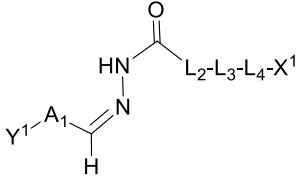
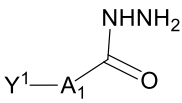
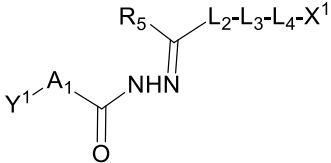
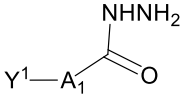
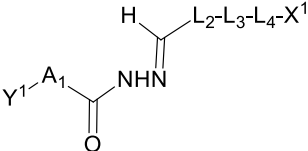
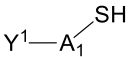
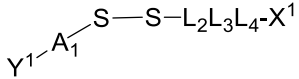
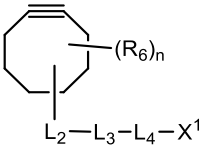
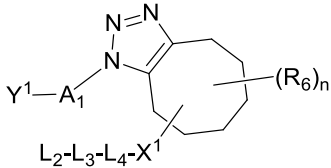
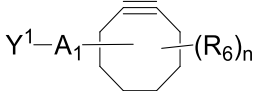
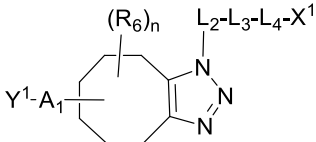
[00314] Produtos exemplares das conexões feitas usando estes componentes são representados na Tabela 5, onde Y^1 representa um anticorpo da invenção, A_1 representa uma unidade de ligação (LU) conectando o anticorpo à carga útil X^a , $-L_2-L_3-L_4-$ na Fórmula II-a representa a Unidade Ligante que pode estar presente em uma molécula a ser conectada ao anticorpo conjugado por meio de X^a , e X^1 representa a carga útil. A carga útil X^a é um grupo funcional reativo, e X^b na Fórmula II-a é o grupo funcional complementar correspondente, e a Fórmula II-a em si representa uma molécula a ser conectada ao

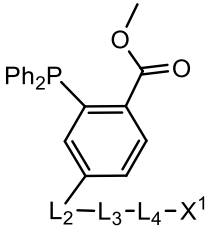
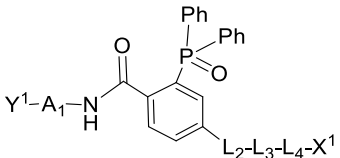
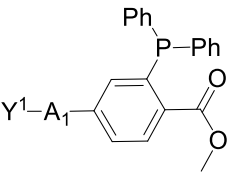
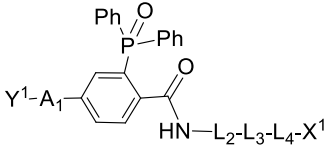
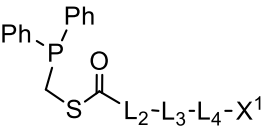
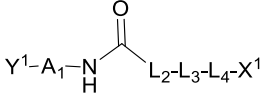
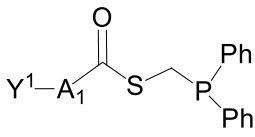
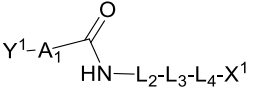
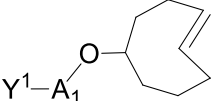
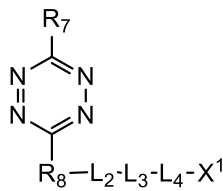
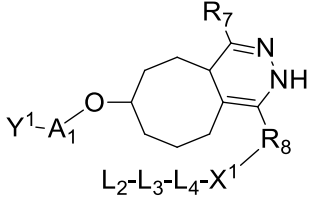
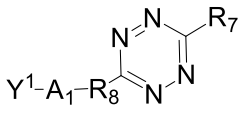
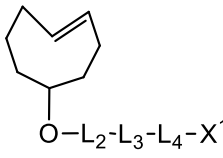
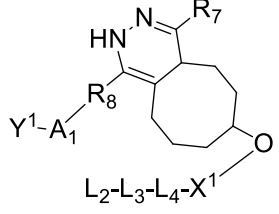
anticorpo conjugado. A terceira coluna na Tabela 5 representa um produto de reação de X^a com X^b .

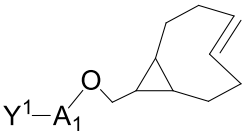
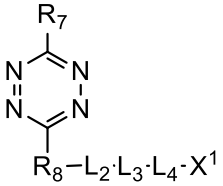
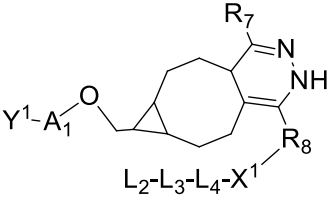
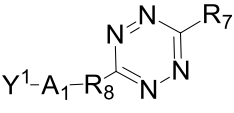
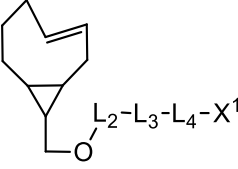
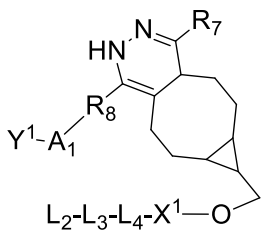
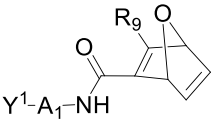
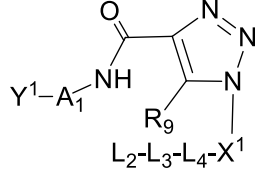
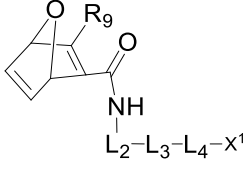
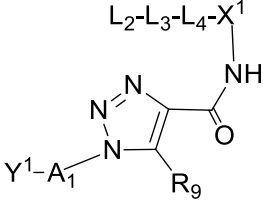
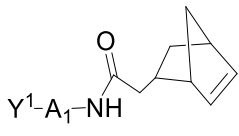
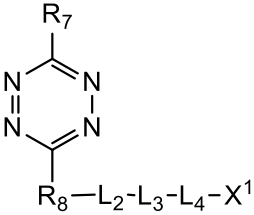
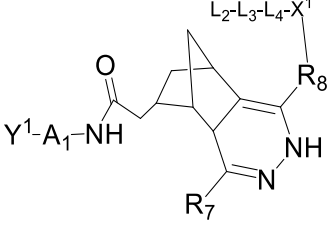
Tabela 5

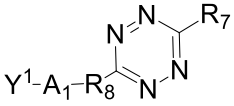
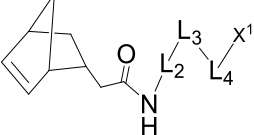
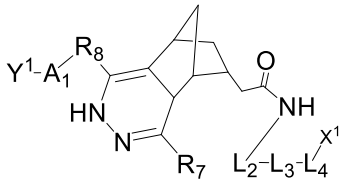
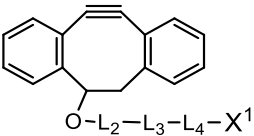
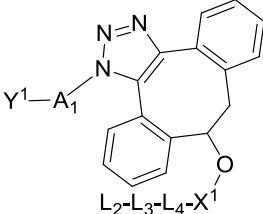
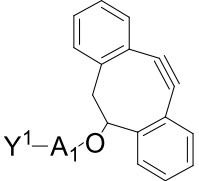
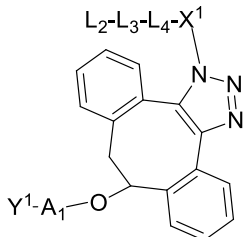
$Y^1-A_1-X^a$	$X^b-L_2-L_3-L_4-X^1$ Formula (II-a)	$Y^1-A_1-X^2-L_2-L_3-L_4-X^1$
$Y^1-A_1-N_3$	$HC\equiv C-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-N_3$	$HC\equiv C-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-C\equiv CH$	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-C\equiv CH$	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$NH_2-O-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$NH_2-O-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-O-NH_2$	$CH_3C(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	

$Y^1-A_1-X^a$	$X^b-L_2-L_3-L_4-X^1$ Formula (II-a)	$Y^1-A_1-X^2-L_2-L_3-L_4-X^1$
	$HC(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$HS-L_2-L_3-L_4-X^1$	
		
		
	$HS-L_2-L_3-L_4-X^1$	
		
	$HS-L_2-L_3-L_4-X^1$	

$Y^1-A_1-X^a$	$X^b-L_2-L_3-L_4-X^1$ Formula (II-a)	$Y^1-A_1-X^2-L_2-L_3-L_4-X^1$
	$NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$R_5C(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$HC(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$HS-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-N_3$		
	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	

Y ¹ -A ₁ -X ^a	X ^b -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹ Formula (II-a)	Y ¹ -A ₁ -X ² -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹
Y ¹ -A ₁ -N ₃		
	N ₃ -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹	
Y ¹ -A ₁ -N ₃		
	N ₃ -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹	
		
		

Y ¹ -A ₁ -X ^a	X ^b -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹ Formula (II-a)	Y ¹ -A ₁ -X ² -L ₂ -L ₃ -L ₄ -X ¹
		
		
	<p>N₃-L₂-L₃-L₄-X¹</p>	
<p>Y¹-A₁-N₃</p>		
		

$Y^1-A_1-X^a$	$X^b-L_2-L_3-L_4-X^1$ Formula (II-a)	$Y^1-A_1-X^2-L_2-L_3-L_4-X^1$
		
$Y^1-A_1-N_3$		
	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	

[00315] Em certas modalidades, o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo fornecido aqui é conjugado com um “grupo X-ao-anticorpo” (carga útil ao anticorpo) relação entre cerca de 1 e 16, tal como 1-12, ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8, em que o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo do mesmo contém 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 resíduos de cisteína incorporados nos sítios específicos descritos aqui. Por exemplo, uma relação de “grupo X-para-anticorpo” de 4 pode ser obtida por incorporação de dois resíduos de Cys na cadeia pesada de um anticorpo, que conterá 4 sítios de conjugação, dois de cada cadeia pesada. Imunoconjugados de tais anticorpos conterão até 4 grupos de carga útil, que podem ser iguais ou diferentes e são preferivelmente todas iguais. Em outro exemplo, uma relação de “grupo X-para-anticorpo” de 4 pode ser obtida incorporando

um resíduo Cys na cadeia pesada e o segundo resíduo Cys na cadeia leve de um anticorpo resultando em 4 sítios de conjugação, dois em duas cadeias pesadas e dois em duas cadeias leves. A relação 6, 8 ou maior pode ser obtida por combinações de 3, 4 ou mais substituições de cisteína da invenção em cadeia pesada e leve do anticorpo. A substituição de múltiplos grupos cisteína em um anticorpo pode levar à formação de dissulfeto inapropriada e outros problemas. Desse modo, para carregar mais do que 4 grupos de carga útil em uma molécula de anticorpo, os métodos da invenção podem alternativamente ser combinados com métodos que não contam com reações no enxofre de cisteína, tal como acilações em lisina, ou conjugação por meio de rótulos S6 ou metodologia Pcl.

[00316] Enquanto que a relação de carga útil para anticorpo tem um valor exato para uma molécula de conjugado específico, é entendido que o valor frequentemente será um valor médio quando usado para descrever uma amostra contendo muitas moléculas, devido a algum grau de homogeneidade, tipicamente na etapa de conjugação. A carga média para uma amostra de um imunocjugado é referida aqui como a relação de fármaco para anticorpo, ou DAR. Em algumas modalidades, a DAR é entre cerca de 1 e cerca de 16, e tipicamente é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8. Em algumas modalidades, pelo menos 50% de uma amostra em peso é composto tendo a relação média mais ou menos 2, e preferivelmente pelo menos 50% da amostra é um conjugado que contém a relação média mais ou menos 1. Modalidades preferidas incluem imunocjugados em que a DAR é de cerca de 2 ou cerca de 8, por exemplo, cerca de 2, cerca de 4, cerca de 6 ou cerca de 8. Em algumas modalidades, a DAR de 'cerca de n' significa que o valor medido para DAR é dentro de 10% de n (na Fórmula (I)).

3. Outra Alteração da Estrutura de Região Fc

[00317] A presente invenção fornece imunocombinados rotulados específicos do sítio. Os imunocombinados da invenção podem compreender anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos dos mesmos que também compreendem modificações para resíduos de estrutura dentro de V_H e/ou V_L , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente tais modificações de estrutura são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, um método é "novamente mutar" um ou mais resíduos de estrutura para a correspondente sequência de linha germinativa. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se as sequências de estrutura de anticorpo às sequências de linha germinativa das quais o anticorpo é derivado. Para retornar as sequências de região de estrutura para sua configuração de linha germinativa, as mutações somáticas podem ser "novamente mutadas" para a sequência de linha germinativa, por exemplo, por mutagênese direcionada ao sítio. Tais anticorpos "novamente mutados" são também destinados a ser abrangidos pela invenção.

[00318] Outro tipo de modificação de estrutura envolve mutação de um ou mais resíduos dentro da região de estrutura, ou mesmo dentro de uma ou mais regiões de CDR, para remover epítopos de células T para desse modo reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Este método é também referido como "desimunização" e é descrito em maiores detalhes na Publicação de Patente dos Estados Unidos No. 20030153043 por Carret *al.*

[00319] Em adição ou alternativa às modificações feitas dentro da estrutura ou regiões de CDR, anticorpos da invenção podem ser construídos para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente

para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como meia-vida de soro, fixação de complemento, ligação de receptor de Fc, e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificadas para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas modalidades é descrita em maiores detalhes abaixo.

[00320] Em uma modalidade, a região de articulação de CH1 é modificada de modo que o número de resíduos de cisteína na região de articulação seja alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Este método é descrito também na Patente dos Estados Unidos No. 5.677.425 por Bodmeret *al.* O número de resíduos de cisteína na região de articulação de CH1 é alterado para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

[00321] Em outra modalidade, a região de articulação Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento de articulação de Fc de modo que o anticorpo tenha ligação de proteína A de estafilococcila (SpA) prejudicada relativa à ligação de SpA de domínio de articulação de Fc nativo. Este método é descrito em maiores detalhes na Patente dos Estados Unidos No. 6.165.745 por Ward *et al.*

[00322] Em ainda outras modalidades, a região de Fc é alterada por substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido com um diferente resíduo de aminoácido para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um diferente resíduo de aminoácido, de modo que o

anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligante efetor, porém retenha a capacidade de ligação a antígeno do anticorpo origem. O ligante efetor para o qual a afinidade é alterada, pode ser, por exemplo, um receptor de Fc ou o componente de C1 de complemento. Este método é descrito, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

[00323] Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados de resíduos de aminoácido podem ser substituídos com um diferente resíduo de aminoácido, de modo que o anticorpo tenha alterado a ligação de C1q e/ou citotoxicidade dependente de complemento reduzido ou abolido (CDC). Este método é descrito, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos No. 6.194.551 por Idusogie *et al.*

[00324] Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácido são alterados para desse modo alterar a capacidade do anticorpo para fixar o complemento. Este método é descrito em, por exemplo, a Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.* Em uma modalidade específica, um ou mais aminoácidos de um anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo da presente invenção são substituídos por um ou mais resíduos de aminoácido alotípico, tal como aqueles mostrados na FIG. 4 para as subclasses IgG1 e o isótipo de kappa. Resíduos de aminoácido alotípicos também incluem, porém não estão limitados à região constante da cadeia pesada das subclasses IgG1, IgG2, e IgG3 bem como a região constante da cadeia leve do isótipo kappa como descrito por Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

[00325] Em ainda outra modalidade, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade do anticorpo para mediar citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ modificando um ou mais aminoácidos. Este método é descrito, por exemplo, na Publicação PCT WO

00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação no IgG1 humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e variantes com ligação melhorada foram descritos (veja Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

[00326] Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser criado (isto é, o anticorpo não possui glicosilação). Glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para "antígeno." Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas, que resultam em eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura de região variável para desse modo eliminar a glicosilação naquele sítio. Tal glicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para antígeno. Tal método é descrito, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.714.350 e 6.350.861 por Co *et al.*

[00327] Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser criado que tem um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado, tendo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo tendo estruturas GlcNac de bisettriz aumentada. Tais padrões de glicosilação alterada foram demonstrados aumentar a capacidade de ADCC de anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com mecanismo de glicosilação alterado. Células com mecanismo de glicosilação alterado foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais expressar anticorpos recombinantes da invenção para desse modo produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, EP 1.176.195 por Hang *et al.* descreve uma linhagem celular com um gene FUT8

funcionalmente rompido, que codifica uma frucosil transferase, tal que anticorpos expressos em tal linhagem celular exibem a hipofucosilação. Publicação PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linhagem de células CHO variantes, células Lecl3, com capacidade reduzida para ligar fucose a carboidratos ligados a Asn(297), também resultando em hipofucosilação de anticorpos expressos naquela células hospedeira (veja também Shields *et al.*, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Publicação PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* descreve linhagens celulares construídas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de modo que anticorpos expressos nas linhagens celulares construídas exibam estruturas GlcNac de dissetriz aumentada o que resulta em atividade aumentada de ADCC dos anticorpos (veja também Umana *et al.*, Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

[00328] Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia-vida biológica. Vários métodos são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, ou T256F, como descrito na Patente dos Estados Unidos No. 6.277.375 por Ward. Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou C_L para conter um epítipo de ligação de receptor de salvamento tirado de duas alças de um domínio de CH2 de uma região Fc de um IgG, como descrito nas Patentes dos Estados Unidos 5.869.046 e 6.121.022 por Presta *et al.*

4. Conjugado de anticorpos

[00329] A presente invenção fornece métodos de rotulagem específicos do sítio, anticorpos modificados e fragmentos de anticorpos dos mesmos, e imunocombinados preparados conseqüentemente. Usando os métodos da invenção, um anticorpo

modificado ou fragmentos de anticorpo do mesmo pode ser conjugado a um rótulo, tal como uma porção de fármaco, por exemplo, um agente anticâncer, um agente de tratamento autoimune, um agente anti-inflamatório, um agente antifúngico, um agente antibacteriano, um agente antiparasítico, um agente antiviral, ou um agente anestésico, ou um reagente de imageamento, tal como um quelante para imageamento de PET, ou um rótulo fluorescente, ou um reagente de contraste de MRI. Um anticorpo ou fragmento de anticorpo pode também ser conjugado usando diversas porções de rotulagem idênticos ou diferentes combinando os métodos da invenção com outros métodos de conjugação.

[00330] Em certas modalidades, os imunoconjugados da presente invenção compreendem uma porção de fármaco selecionado de um inibidor de V-ATPase, um inibidor de HSP90, um inibidor de IAP, um inibidor de mTor, um estabilizador de microtúbulo, um desestabilizador de microtúbulo, uma auristatina, uma dolastatina, um maitansinoide, um MetAP (metionina aminopeptidase), um inibidor de exportação nuclear de proteínas CRM1, um inibidor de DPPIV, inibidores de proteassoma, um inibidor de reações de transferência de fosforila em mitocôndrias, um inibidor de síntese de proteína, um inibidor de cinase, um inibidor de CDK2, um inibidor de CDK9, um inibidor de HDAC, um agente de dano ao DNA, um agente de alquilação de DNA, um intercalador de DNA, um aglutinante de ranhura menor de DNA, inibidores de topoisomerase, inibidores de síntese de RNA, inibidores de cinesina, inibidores de interações proteína-proteína, e um inibidor de DHFR.

[00331] Além disso, os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos da presente invenção podem ser conjugados a uma porção de fármaco que modifica uma resposta biológica dada. Porções de fármaco não devem ser construídas como limitadas a agentes

terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser um modulador imune, tal como um imunopotenciador, um imunopotenciador de pequena molécula, um agonista de TLR, um oligômero de CpG, um agonista de TLR2, um agonista de TLR4, um agonista de TLR7, um agonista de TLR9, um agonista de TLR8, um peptídeo de epítipo de células T, ou similares. A porção de fármaco pode também ser um oligonucleotídeo, um siRNA, um shRNA, um cDNA, ou similares. Alternativamente, a porção de fármaco pode ser uma proteína, peptídeo, ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, toxina da cólera, ou toxina de difteria, uma proteína tal como fator de necrose de tumor, α -interferon, β -interferon, fator de crescimento de nervo, fator de crescimento derivado de plaqueta, ativador de plasminogênio de tecido, uma citocina, um agente apoptótico, um agente antiangiogênico, ou, um modificador de resposta biológica tal como, por exemplo, uma linfocina.

[00332] Em uma modalidade, os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos da presente invenção são conjugados a uma porção de fármaco, tal como é uma citotoxina, um fármaco (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Exemplos de citotoxina incluem, porém não estão limitados a, taxanos (veja, por exemplo, Pedido de Patente Internacional (PCT) Nos. WO 01/38318 e PCT/US03/02675), agentes de alquilação de DNA (por exemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, maitansinoides, e agentes citotóxicos, compreendendo uma porção de polietileno glicol reativa (veja, por exemplo, Sasse *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco *et*

al., Blood (2003) (publicação eletrônica antes da publicação impressa), Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738, e 6.436.931, Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2001/0036923 A1, Pedido de Patente dos Estados Unidos Pendente Ser. Nos. 10/024.290 e 10/116.053, e Pedido de Patente Internacional (PCT) No. WO 01/49698), taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromato de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticoides, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, anti-metabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de ablação (por exemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucila, meifalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina, antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes antimetabólicos (por exemplo, vincristina e vinblastina). (veja, por exemplo, Seattle Genetics US20090304721).

[00333] Outros exemplos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas com os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas, e derivados do mesmo. Um exemplo de um conjugado de caliqueamicina de anticorpo é comercialmente disponível (Mylotarg[™]; Wyeth-Ayerst).

[00334] Para uma discussão mais aprofundada de tipos de citotóxicas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos a anticorpos, veja também Saito *et al.*, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev.

55:199-215; Trail *et al.*, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan e Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter e Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

[00335] De acordo com a presente invenção, anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos dos mesmos podem também ser conjugados a um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos, referidos como rádio-imunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados a anticorpos para uso diagnosticamente ou terapeuticamente incluem, porém não estão limitados a, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰, e lutétio¹⁷⁷. Métodos para a preparação de rádio-imunoconjugados são estabelecidos na técnica. Exemplos de rádio-imunoconjugados são comercialmente disponíveis, incluindo ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) e BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), e métodos similares podem ser usados para preparar rádio-imunoconjugados usando os anticorpos da invenção. Em certas modalidades, o quelante macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que pode ser ligado ao anticorpo por meio de uma molécula ligante. Tais moléculas ligantes são comumente conhecidas na técnica e descritas em Denardo *et al.*, (1998) *Clin. Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; e Zimmerman *et al.*, (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50, cada qual incorporado por referência em sua íntegra.

[00336] A presente invenção também fornece anticorpos modificados ou fragmentos dos mesmos que especificamente se ligam a um antígeno. Os anticorpos modificados ou fragmentos podem ser conjugados ou fundidos a uma proteína heteróloga ou polipeptídeo (ou fragmento do mesmo, preferivelmente a um polipeptídeo de pelo

menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos) para gerar proteínas de fusão. Em particular, a invenção fornece proteínas de fusão compreendendo um fragmento de anticorpo descrito aqui (por exemplo, um fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, um domínio V_H, um CDR V_H, um domínio V_L ou uma CDR V_L) e uma proteína heteróloga, polipeptídeo, ou peptídeo.

[00337] Em algumas modalidades, fragmentos de anticorpo modificado sem especificidade de ligação a antígeno, tal como porém não limitados a, domínios Fc modificados com resíduo(s) de cisteína construída de acordo com a presente invenção, são usados para gerar proteínas de fusão compreendendo tal fragmento de anticorpo (por exemplo, Fc construída) e uma proteína heteróloga, polipeptídeo, ou peptídeo.

[00338] Proteínas de fusão adicionais podem ser geradas por meio de técnicas de emaranhamento de gene, emaranhamento de motivo, emaranhamento de éxon, e/ou emaranhamento de códon (coletivamente referido como “emaranhamento de DNA”). Emaranhamento de DNA pode ser empregado para alterar as atividades de anticorpos da invenção ou fragmentos dos mesmos (por exemplo, anticorpos ou fragmentos dos mesmos com maiores afinidades e menores taxas de dissociação). Veja, geralmente, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, e 5.837.458; Patten *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; e Lorenzo e Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313 (cada uma destas patentes e publicações é pelo presente incorporada por referência em sua totalidade). Anticorpos ou fragmentos dos mesmos, ou os anticorpos codificados

ou fragmentos dos mesmos, podem ser alterados sendo submetidos à mutagênese aleatória por PCR propensa a erro, inserção de nucleotídeo aleatória ou outros métodos antes da recombinação. Um polinucleotídeo codificando um anticorpo ou fragmento do mesmo que especificamente se liga a um antígeno pode ser recombinado com um ou mais componentes, motivos, secções, partes, domínios, fragmentos, etc. de uma ou mais moléculas heterólogas.

[00339] Além disso, os anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos dos mesmos da presente invenção podem ser conjugados a sequências marcadoras, tal como um peptídeo para facilitar a purificação. Em modalidades preferidas, a sequência de aminoácido marcadora é um peptídeo hexa-histidina, tal como o rótulo fornecido em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outros, muitos dos quais são comercialmente disponíveis. Como descrito em Gents *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por exemplo, hexa-histidina fornece publicação conveniente da proteína de fusão. Outros rótulos de peptídeo úteis para purificação incluem, porém não estão limitados ao rótulo de hemaglutinina (“HA”), que corresponde a um epítipo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, (1984) Cell 37:767), e o rótulo “FLAG” (A. Einhauer *et al.*, J. Biochem. Biophys. Métodos 49: 455–465, 2001). De acordo com a presente invenção, anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem também ser conjugados a peptídeos de penetração de tumor a fim de realçar sua eficácia.

[00340] Em outras modalidades, anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos da presente invenção são conjugados a um agente diagnóstico ou detectável. Tais imunocombinados podem ser úteis para monitorar ou prognosticar o início, desenvolvimento, progressão e/ou severidade de uma doença ou distúrbio como parte de um procedimento de teste clínico, tal como determinando a eficácia

de uma terapia particular. Tal diagnóstico e detecção podem ser realizados por acoplamento do anticorpo a substâncias detectáveis incluindo, porém não limitadas a, várias enzimas, tais como, porém não limitadas a, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; grupos protéticos, tais como, porém não limitados a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; materiais fluorescentes, tais como, porém não limitados a, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rhodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como, porém não limitados a, luminol; materiais bioluminescentes, tais como, porém não limitados a, luciferase, luciferina, e aequorina; materiais radioativos, tais como, porém não limitados a, iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , e ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , e ^{111}In), tecnécio (^{99}Tc), tálio (^{201}Tl), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd), molibdênio (^{99}Mo), xenônio (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{64}Cu , ^{113}Sn , e ^{117}Sn ; e metais de emissão de pósitron usando várias tomografias por emissão de pósitron, e íons de metal paramagnético não radioativo.

[00341] Anticorpos modificados ou fragmentos de anticorpos da invenção podem também ser ligados a suportes sólidos, que são particularmente úteis para imunoenaios ou purificação do antígeno alvo. Tais suportes sólidos incluem, porém não estão limitados a, vidro, celulose, poliácridamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila ou polipropileno.

5. Composição Farmacêutica

[00342] Para preparar composições farmacêuticas ou estéreis incluindo imunocombinados, os imunocombinados da invenção são misturados com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. As composições podem adicionalmente conter um ou mais outros agentes terapêuticos que são adequados para tratar ou prevenir câncer (câncer de mama, câncer colorretal, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer gástrico, câncer pancreático, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, osteossarcoma, carcinoma de células escamosas, tumores da bainha de nervosa periférica (por exemplo, *schwannoma*), câncer da cabeça e pescoço, câncer da bexiga, câncer esofágico, câncer esofágico de Barretts, glioblastoma, sarcoma de células clara de tecido mole, mesotelioma, neurofibromatose, câncer renal, melanoma, câncer da próstata, hiperplasia prostática benigna (BPH), ginecomastia, e endometriose).

[00343] Formulações de agentes terapêuticos e diagnósticos podem ser preparadas misturando-se com veículos, excipientes, ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis na forma de, por exemplo, pós liofilizados, suspensões, soluções aquosas, loções, ou suspensões (veja, por exemplo, Hardman *et al.*, Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nova Iorque, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, e Wilkins, Nova Iorque, N.Y., 2000; Avis, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner e Kotkoskie, Excipient Toxicity e Safety, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.Y., 2000).

[00344] A seleção de um regime de administração para uma terapêutica depende de diversos fatores, incluindo a taxa de renovação de soro ou tecido da entidade, o nível de sintomas, a imunogenicidade da entidade, e a acessibilidade das células alvo na matriz biológica. Em certas modalidades, um regime de administração maximiza a quantidade de terapêutica liberada para o paciente, consistente com um nível aceitável de efeitos colaterais. Consequentemente, a quantidade de biológico liberada depende em parte da entidade particular e a severidade da condição que está sendo tratada. Orientação em seleção das doses apropriadas de anticorpos, citocinas, e moléculas pequenas está disponível (veja, por exemplo, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Anticorpos, Cytokines e Arthritis*, Marcel Dekker, Nova Iorque, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Anticorpos e Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nova Iorque, N.Y., 1993; Baert *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom *et al.*, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon *et al.*, *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz *et al.*, *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky *et al.*, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000).

[00345] Determinação da dose apropriada é feita pelo médico, por exemplo, usando parâmetros ou fatores conhecidos ou suspeitos na técnica afetarem o tratamento ou predito afetarem o tratamento. Geralmente, a dose começa com uma quantidade um pouco menor do que a dose ideal e ela é aumentada por pequenos incrementos, em seguida até o efeito desejado ou ideal ser obtido com relação a quaisquer efeitos colaterais negativos. Importantes medidas diagnósticas incluem aqueles de sintomas de, por exemplo, a inflamação ou nível de citocinas inflamatórias produzidas.

[00346] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados a fim de obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para obter a resposta terapêutica desejado para um paciente particular, composição, e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos, incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou o éster, sal ou amida das mesmas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular que está sendo empregado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente que está sendo tratado, e fatores semelhantes conhecidos nas técnicas médicas.

[00347] Composições compreendendo anticorpos ou fragmentos dos mesmos da invenção podem ser fornecidas por infusão contínua, ou por doses em intervalos de, por exemplo, um dia, uma semana, ou 1 a 7 vezes por semana. Doses podem ser fornecidas intravenosamente, subcutaneamente, topicamente, oralmente, nasalmente, retalmente, intramuscular, intracerebralmente, ou por inalação. Um protocolo de dose específica é aqueles envolvendo a dose máxima ou frequência de dose que evita significantes efeitos colaterais indesejáveis.

[00348] Para os imunocombinados da invenção, a dosagem administrada a um paciente pode ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg do peso corporal do paciente. A dosagem pode ser entre 0,0001 mg/kg e 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 5 mg/kg, 0,0001 e 2 mg/kg, 0,0001 e 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg e 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg,

0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg ou 0,01 a 0,10 mg/kg do peso corporal do paciente. A dosagem dos anticorpos ou fragmentos dos mesmos da invenção pode ser calculada usando o peso do paciente em quilogramas (kg) multiplicado pela dose a ser administrada em mg/kg.

[00349] As doses dos imunocombinados da invenção podem ser repetidas e as administrações podem ser separadas por pelo menos 1 dia, 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias, 2 meses, 75 dias, 3 meses, ou pelo menos 6 meses. Em uma modalidade específica, as doses dos imunocombinados da invenção são repetidas a cada 3 semanas.

[00350] Uma quantidade eficaz para um paciente particular pode variar dependendo de fatores tais como a condição que está sendo tratada, a saúde geral do paciente, o método, via e dose de administração e a severidade de efeitos colaterais (veja, por exemplo, Maynard *et al.*, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory e Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001).

[00351] A via de administração pode ser, por exemplo, aplicação tópica ou cutânea, injeção ou infusão por via intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intra-cerebroespinhal, intralesional, ou por sistemas de liberação sustentada ou um implante (veja, por exemplo, Sidman *et al.*, Biopolimers 22:547-556, 1983; Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.350.466 e 6.316.024). Onde necessário, a composição pode também incluir um agente solubilizante e um anestésico local, tal como lidocaína para reduzir a dor no sítio da injeção. Além disso, a

administração pulmonar pode também ser empregada, por exemplo, pelo uso de um inalador ou nebulizador, e formulação com um agente aerossolizante. Veja, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, e 4.880.078; e Publicações PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, e WO 99/66903, cada uma das quais é incorporada aqui por referência em sua íntegra.

[00352] Uma composição da presente invenção pode também ser administrada por meio de uma ou mais vias de administração usando uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo técnico versado, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. Vias de administração selecionadas para os imunocombinados da invenção incluem vias intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneais, subcutâneas, espinhais ou outras vias parenterais de administração, por exemplo, por injeção ou infusão. A administração parenteral pode representar modos de administração exceto administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intraesternal e infusão. Alternativamente, uma composição da invenção pode ser administrada por meio de uma via não parenteral, tal como uma via de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por exemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, retalmente, sublingualmente ou topicamente. Em uma modalidade, os imunocombinados da invenção são administrados por infusão. Em outra modalidade, os imunocombinados da invenção são administrados subcutaneamente.

[00353] Se os imunocombinados da invenção são administrados em um Sistema de liberação controlada ou liberação sustentada, uma bomba pode ser usada para obter liberação controlada ou sustentada (veja Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507, 1980; Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989). Materiais poliméricos podem ser usados para obter liberação controlada ou sustentada das terapias da invenção (veja, por exemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design e Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque, 1984; Ranger e Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983; veja também Levy *et al.*, *Science* 228:190, 1985; During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 7 1:105, 1989; Patente dos Estados Unidos No. 5.679.377; Patente dos Estados Unidos No. 5.916.597; Patente dos Estados Unidos No. 5.912.015; Patente dos Estados Unidos No. 5.989.463; Patente dos Estados Unidos No. 5.128.326; Publicação PCT No. WO 99/15154; e Publicação PCT No. WO 99/20253. Exemplos de polímeros usados em formulações de liberação sustentada incluem, porém não estão limitados a, poli(2-hidróxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), ácido poli(acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), ácido poli(metacrílico), poliglicolídeos (PLG), polianidridos, poli(N-vinil pirrolidona), álcool poli(vinílico), poliacrilamida, poli(etileno glicol), polilactídeos (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeos) (PLGA), e poliortoésteres. Em uma modalidade, o polímero usado em uma formulação de liberação sustentada é inerte, livre de impurezas lixiviáveis, estável em armazenagem, estéril, e biodegradável. Um sistema de liberação controlada ou sustentada pode ser colocado em proximidade do alvo profilático ou terapêutico, desse modo requerendo apenas uma fração da dose sistêmica (veja,

por exemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

[00354] Sistemas de liberação controlada são descritos na revisão por Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990). Qualquer técnica conhecida por alguém versado na técnica pode ser usada para produzir formulações de liberação sustentada compreendendo um ou mais imunocjugados da invenção. Veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos No. 4.526.938, Publicação PCT WO 91/05548, Publicação PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, 1996; Song *et al.*, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek *et al.*, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997; e Lam *et al.*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997, cada dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[00355] Se os imunocjugados da invenção são administrados topicamente, eles podem ser formulados na forma de um unguento, creme, emplastro transdérmica, loção, gel, xampu, *spray*, aerossol, solução, emulsão, ou outra forma bem conhecida por alguém versado na técnica. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19a. edição, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosagem tópica não vaporizáveis, formas viscosas a semissólidas ou sólidas, compreendendo um veículo ou um ou mais excipientes compatíveis com a aplicação tópica e tendo uma viscosidade dinâmica, em alguns casos, maior do que a da água são tipicamente empregados. Formulações adequadas incluem, sem limitação, soluções, suspensões, emulsões, cremes, unguentos, pós, linimentos, pomadas, e similares, que são, se desejado, esterilizados ou misturados com agentes auxiliares (por exemplo, preservativos, estabilizantes, agentes umectantes, tampões, ou sais) para influenciar várias propriedades,

tais como, por exemplo, pressão osmótica. Outras formas de dosagem tópica adequadas incluem preparações aerossóis vaporizáveis, nas quais o ingrediente ativo, em alguns casos, em combinação com um veículo inerte sólido ou líquido, é empacotado em uma mistura com um volátil pressurizado (por exemplo, um propelente gasoso, tal como Freon™) ou em um frasco de pressão. Umidificantes ou umectantes podem também ser adicionados a composições farmacêuticas e formas de dosagem se desejado. Exemplos de tais ingredientes adicionais são bem conhecidos na técnica.

[00356] Se as composições compreendendo os imunocombinados são administradas intranasalmente, elas podem ser formuladas em uma forma de aerossol, *spray*, névoa ou na forma de gotas. Em particular, agentes profiláticos ou terapêuticos para uso de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente liberados na forma de uma apresentação de *spray* aerossol de pacotes pressurizados ou um nebulizador, com um propelente adequado (por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado). No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada fornecendo uma válvula para liberar uma quantidade dosificada. Cápsulas e cartuchos (compostos de, por exemplo, gelatina) para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados contendo uma mistura em pó do composto e uma base em pó adequada, tal como lactose ou amido.

[00357] Métodos para coadministração ou tratamento com um segundo agente terapêutico, por exemplo, uma citocina, esteroide, agente quimioterápico, antibiótico, ou radiação, são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Hardman *et al.*, (eds.) (2001) Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10, sup.th ed., McGraw-Hill, Nova Iorque, N.Y.; Poole e Peterson (eds.) (2001)

Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner e Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy e Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Uma quantidade eficaz de terapêutico pode diminuir os sintomas em pelo menos 10%; em pelo menos 20%; pelo menos cerca de 30%; pelo menos 40%, ou pelo menos 50%.

[00358] Terapias adicionais (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos), que podem ser administradas em combinação com os imunocombinados da invenção podem ser administradas menos do que 5 minutos de intervalo, menos do que 30 minutos de intervalo, 1 hora de intervalo, em cerca de 1 hora de intervalo, em cerca de 1 a cerca de 2 horas de intervalo, em cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de intervalo, em cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de intervalo, em cerca de 4 horas a cerca de 5 horas de intervalo, em cerca de 5 horas a cerca de 6 horas de intervalo, em cerca de 6 horas a cerca de 7 horas de intervalo, em cerca de 7 horas a cerca de 8 horas de intervalo, em cerca de 8 horas a cerca de 9 horas de intervalo, em cerca de 9 horas a cerca de 10 horas de intervalo, em cerca de 10 horas a cerca de 11 horas de intervalo, em cerca de 11 horas a cerca de 12 horas de intervalo, em cerca de 12 horas a 18 horas de intervalo, 18 horas a 24 horas de intervalo, 24 horas a 36 horas de intervalo, 36 horas a 48 horas de intervalo, 48 horas a 52 horas de intervalo, 52 horas a 60 horas de intervalo, 60 horas a 72 horas de intervalo, 72 horas a 84 horas de intervalo, 84 horas a 96 horas de intervalo, ou 96 horas a 120 horas de intervalo dos imunocombinados da invenção. As duas ou mais terapias podem ser administradas dentro de uma mesma visita do paciente.

[00359] Em certas modalidades, os imunocombinados da invenção podem ser formulados para garantir distribuição adequada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos

altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomos. Para métodos de fabricação de lipossomos, veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos Nos. 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomos podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas em órgãos ou células específicas, desse modo realçam liberação de fármaco alvejado (veja, por exemplo, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Porções de alveamento exemplares incluem folato ou biotina (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos No. 5.416.016 em Low e *outro*); mannosides (Umezawa e *outro*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); antibodies (Bloeman e *outro*, (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais e *outro*, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe e *outro*, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier e *outro*, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); veja também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

[00360] A invenção fornece protocolos para a administração de composição farmacêutica compreendendo imunoconjugados da invenção sozinhos ou em combinação com outras terapias a um indivíduo em necessidade da mesma. As terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da presente invenção podem ser administradas concomitantemente ou sequencialmente a um indivíduo. A terapia (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da presente invenção pode também ser ciclicamente administrada. Terapia de ciclização envolve a administração de uma primeira terapia (por exemplo, um primeiro agente profilático ou terapêutico) durante um período de tempo, seguida pela administração de uma segunda

terapia (por exemplo, um segundo agente profilático ou terapêutico) durante um período de tempo e repetindo esta administração sequencial, isto é, o ciclo, a fim de reduzir o desenvolvimento de resistência a uma das terapias (por exemplo, agentes) para evitar ou reduzir os efeitos colaterais de uma das terapias (por exemplo, agentes), e/ou melhorar, a eficácia das terapias.

[00361] As terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) das terapias de combinação da invenção podem ser administradas a um indivíduo concorrentemente.

[00362] O termo "concorrentemente" não é limitado à administração de terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) exatamente no mesmo tempo, mas entende-se que as composições farmacêuticas compreendendo anticorpos ou fragmentos dos mesmos da invenção são administradas a um indivíduo em uma sequência e dentro de um intervalo de tempo tal que os anticorpos da invenção possam agir juntamente com a outra terapia ou terapias para fornecer um benefício aumentado do que se elas fossem administradas de outro modo. Por exemplo, cada terapia pode ser administrada a um indivíduo ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem em diferentes pontos no tempo; contudo, se não administradas ao mesmo tempo, elas devem ser administradas suficientemente próximas no tempo a fim de fornecer o efeito terapêutico ou profilático desejado. Cada terapia pode ser administrada a um indivíduo separadamente, em qualquer forma apropriada e por qualquer via adequada. Em várias modalidades, as terapias (por exemplo, agentes profiláticos ou terapêuticos) são administradas a um indivíduo menos do que 15 minutos, menos do que 30 minutos, menos do que 1 hora de intervalo, em cerca de 1 hora de intervalo, em cerca de 1 hora a cerca de 2 horas de intervalo, em cerca de 2 horas a cerca de 3 horas de intervalo, em cerca de 3 horas a cerca de 4 horas de intervalo, em

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

[00363] Os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados a um indivíduo na mesma composição farmacêutica. Alternativamente, os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação podem ser administrados concorrentemente a um indivíduo em composições farmacêuticas separadas. Os agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser administrados a um indivíduo pela mesma ou diferentes vias de administração.

[00364] A invenção foi totalmente descrita, ela é também ilustrada pelos seguintes exemplos e reivindicações, que são ilustrativos e não destinam-se a ser também limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Seleção de sítios acessíveis de superfície para mutação Cys em cadeia pesada IgG1 humana e cadeia leve kappa.

[00365] Resíduos expostos à superfície na região constante de cadeias leves capa humanas e pesadas de IgG1 humana foram identificados em uma estrutura cristal de um anticorpo hIgG1/kappa (Entrada de estrutura de banco de dados de proteína 1HZH.pdb, Tabela 6, Tabela 7, FIG. 1) usando o programa de computador

Surface Racer 5.0, como descrito por Tsodikov e outro, "A novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature," *J. Comput. Chem.*, 23, 600-609 (2002). 88 Resíduos foram selecionados para substituição Cys, 59 sítios em cadeia pesada hIgG e 29 em cadeia leve capa humana, baseados nos seguintes critérios: 1) selecionar resíduos em domínios CH1, CH2 e CH3 das regiões constantes de cadeia pesada e as regiões constantes de cadeia leve; 2) selecionar resíduos expostos à superfície, porém, burlar resíduos globalmente expostos e a região de terminal C para evitar a formação de dímero interanticorpo; 3) focar em resíduos carregados ou polares tais como Ser, Thr, Lys, Arg, Glu, e Asp; e 4) excluir resíduos em domínio de ligação de FcRn, domínio de ligação de proteína A, e região de articulação de cadeia pesada.

[00366] Critério 1) a saber, a seleção de sítios de substituição Cys na região constante do anticorpo, assegura a transferabilidade dos sítios de conjugação para muitos diferentes anticorpos. Critério 2) é baseado na observação de formação de dímero interanticorpo para substituições Cys de resíduos proeminentemente expostos (Resíduos excluídos com base neste critério são listados na Tabela 6). Baseado na estrutura cristal de IgG, a orientação putativa da cadeia lateral Cys foi levada em consideração: Resíduos para os quais a cadeia lateral Cys pode ser parcialmente blindada de interações com outro anticorpo, porém pode ainda ser reativa com uma pequena carga útil molecular, foram favorecidos sobre resíduos com maior acessibilidade de superfície, porém com uma orientação que pode ativar interações com uma macromolécula grande tal como formação de dímero. Critério 3) foi implementado para favorecer mutações conservativas a fim de minimizar efeitos desestabilizantes das mutações sobre o anticorpo. Similarmente, critério 4) foi usado para evitar mudanças

funcionais para o anticorpo tais como efeitos sobre ligação de FcRn e Proteína A que podem afetar as propriedades farmacocinéticas de anticorpo ou podem resultar na perda de uma alça de purificação, respectivamente. Resíduos excluídos com base no critério 4 são listados na Tabela 6. A locação dos 88 sítios de mutação selecionados no modelo de estrutura de hIgG1/capa indica que os sítios selecionados são acessíveis de superfície (FIG. 2).

Tabela 6. Acessibilidade de superfície de resíduos de aminoácido em cadeia pesada IgG1 humana. Acessibilidade de superfície foi calculada usando Surface Racer 5.0 e é expressa como Angstrom square [\AA^2]. “Sítios excluídos” indicam os sítios que são excluídos de seleção devido às razões mencionadas no exemplo 1. “Sítios selecionados” são os sítios que são selecionados para substituição para Cys na invenção.

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [\AA^2]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
117	SER	128		HC-S117C
118	ALA	2		
119	SER	79		HC-S119C
120	THR	71		
121	LYS	136		HC-K121C
122	GLY	21		
123	PRO	2		
124	SER	40		HC-S124C
125	VAL	0		
126	PHE	1		
127	PRO	0		
128	LEU	0		
129	ALA	0		
130	PRO	0		
131	SER	0		
132	SER	34		HC-S132C
133	LYS	87		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
134	SER	123		HC-S134C
135	THR	1		
136	SER	183		HC-S136C
137	GLY	84		
138	GLY	40		
139	THR	33		HC-T139C
140	ALA	0		
141	ALA	0		
142	LEU	0		
143	GLY	0		
144	CYS	0		
145	LEU	0		
146	VAL	0		
147	LYS	0		
148	ASP	1		
149	TYR	0		
150	PHE	0		
151	PRO	0		
152	GLU	52		HC-E152C
153	PRO	89		HC-P153C
154	VAL	10		
155	THR	69		HC-T155C
156	VAL	0		
157	SER	39		HC-S157C
158	TRP	0		
159	ASN	4		
160	SER	164	Dímero	
161	GLY	35	Dímero	
162	ALA	115	Dímero	
163	LEU	17		
164	THR	125		HC-T164C
165	SER	183		HC-S165C
166	GLY	20		
167	VAL	12		
168	HIS	5		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
169	THR	60		HC-T169C
170	PHE	0		
171	PRO	33		HC-P171C
172	ALA	9		
173	VAL	0		
174	LEU	68		HC-L174C
175	GLN	0		
176	SER	162		HC-S176C
177	SER	68		HC-S177C
178	GLY	8		
179	LEU	0		
180	TYR	6		
181	SER	0		
182	LEU	2		
183	SER	0		
184	SER	0		
185	VAL	0		
186	VAL	0		
187	THR	30		
188	VAL	0		
189	PRO	86		HC-P189C
190	SER	21		
191	SER	127		HC-S191C
192	SER	17		
193	LEU	0		
194	GLY	18		
195	THR	111		HC-T195C
196	GLN	79		
197	THR	90		HC-T197C
198	TYR	0		
199	ILE	25		
200	CYS	0		
201	ASN	8		
202	VAL	0		
203	ASN	22		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
204	HIS	0		
205	LYS	217		HC-K205C
206	PRO	66		
207	SER	50		HC-S207C
208	ASN	91		
209	THR	24		
210	LYS	234	Dímero	
211	VAL	30		
212	ASP	97		HC-D212C
213	LYS	70		
214	LYS	146		
215	ALA	0		
216	GLU	79		
217	PRO	0		
218	LYS	4		
219	SER	149		
220	CYS	7		
221	ASP	0	Articulação	
222	LYS	208	Articulação	
223	THR	112	Articulação	
224	HIS	1	Articulação	
225	THR	22	Articulação	
226	CYS	12	Articulação	
227	PRO	22	Articulação	
228	PRO	133	Articulação	
229	CYS	7	Articulação	
230	PRO	84	Articulação	
231	ALA	114	Articulação	
232	PRO	49	Articulação	
233	GLU	114	Articulação	
234	LEU	90		
235	LEU	88		
236	GLY	9		
237	GLY	46		
238	PRO	14		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
239	SER	9		
240	VAL	0		
241	PHE	0		
242	LEU	0		
243	PHE	1		
244	PRO	34		
245	PRO	0		
246	LYS	55		HC-K246C
247	PRO	18		
248	LYS	47		
249	ASP	1		
250	THR	0	Ligação de FcRn	
251	LEU	0		
252	MET	53	ligação de Proteína A, FcRn	
253	ILE	155	ligação de Proteína A	
254	SER	157	ligação de Proteína A, FcRn	
255	ARG	103		
256	THR	86	ligação de FcRn	
257	PRO	0	ligação de FcRn	
258	GLU	42		HC-E258C
259	VAL	0	ligação de FcRn	
260	THR	0		
261	CYS	0		
262	VAL	0		
263	VAL	0		
264	VAL	0		
265	ASP	11	ligação de FcRn	
266	VAL	0		
267	SER	10		
268	HIS	79		
269	GLU	189		HC-E269C
270	ASP	23		
271	PRO	20		
272	GLU	152		
273	VAL	19		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
274	LYS	138		HC-K274C
275	PHE	2		
276	ASN	1		
277	TRP	0		
278	TYR	14		
279	VAL	0		
280	ASP	66		
281	GLY	72		
282	VAL	141		
283	GLU	80		
284	VAL	25		
285	HIS	133		
286	ASN	119		HC-N286C
287	ALA	67		
288	LYS	182		HC-K288C
289	THR	5		
290	LYS	177		HC-K290C
291	PRO	51		
292	ARG	252		HC-R292C
293	GLU	83		HC-E293C
294	GLU	73		HC-E294C
295	GLN	170		
296	TYR	29		
297	ASN	61	Glicosilação	
298	SER	125	Glicosilação	
299	THR	2	Glicosilação	
300	TYR	28		
301	ARG	18		
302	VAL	0		
303	VAL	10		
304	SER	0		
305	VAL	17		
306	LEU	0		
307	THR	27	ligação de FcRn	
308	VAL	0	Ligação de FcRn	

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
309	LEU	122		
310	HIS	4	ligação de Proteína A	
311	GLN	145	ligação de Proteína A, FcRn	
312	ASP	14		
313	TRP	0		
314	LEU	6	ligação de Proteína A	
315	ASN	151	ligação de Proteína A	
316	GLY	12		
317	LYS	81		
318	GLU	49		
319	TYR	0		
320	LYS	55		HC-K320C
321	CYS	0		
322	LYS	78		HC-K322C
323	VAL	0		
324	SER	0		
325	ASN	0		
326	LYS	213		HC-K326C
327	ALA	10		
328	LEU	9		
329	PRO	158		
330	ALA	96		HC-A330C
331	PRO	44		
332	ILE	32		
333	GLU	85		HC-E333C
334	LYS	50		HC-K334C
335	THR	70		HC-T335C
336	ILE	13		
337	SER	15		HC-S337C
338	LYS	0		
339	ALA	37		
340	LYS	217	ligação de Proteína A	
341	GLY	37		
342	GLN	235		
343	PRO	42		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
344	ARG	98		HC-R344C
345	GLU	105		
346	PRO	0		
347	GLN	24		
348	VAL	3		
349	TYR	3		
350	THR	0		
351	LEU	0		
352	PRO	38		
353	PRO	0		
354	SER	0		
355	ARG	249		HC-R355C
356	ASP	53		
357	GLU	0		
358	LEU	36		
359	THR	144	Dímero	
360	LYS	114		HC-K360C
361	ASN	155		
362	GLN	41		HC-Q362C
363	VAL	0		
364	SER	0		
365	LEU	0		
366	THR	0		
367	CYS	0		
368	LEU	0		
369	VAL	0		
370	LYS	1		
371	GLY	0		
372	PHE	0		
373	TYR	23		
374	PRO	0		
375	SER	29		HC-S375C
376	ASP	9		
377	ILE	11		
378	ALA	11		

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
379	VAL	4		
380	GLU	18	ligação de FcRn	
381	TRP	0		
382	GLU	22		HC-E382C
383	SER	1		
384	ASN	147		
385	GLY	102	Dímero	
386	GLN	161		
387	PRO	99		
388	GLU	4		
389	ASN	189		HC-N389C
390	ASN	36		HC-N390C
391	TYR	44		
392	LYS	82		HC-K392C
393	THR	36		HC-T393C
394	THR	0		
395	PRO	72		
396	PRO	47		
397	VAL	9		
398	LEU	111		HC-L398C
399	ASP	0		
400	SER	81		HC-S400C
401	ASP	68		
402	GLY	29		
403	SER	0		
404	PHE	22		
405	PHE	0		
406	LEU	0		
407	TYR	0		
408	SER	0		
409	LYS	0		
410	LEU	0		
411	THR	0		
412	VAL	0		
413	ASP	80		HC-D413C

número Eu	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Razão para exclusão (se aplicável)	Sítios selecionados
414	LYS	83		
415	SER	69		HC-S415C
416	ARG	53		
417	TRP	0		
418	GLN	108		
419	GLN	177		
420	GLY	39		
421	ASN	35		
422	VAL	81		HC-V422C
423	PHE	0		
424	SER	2		
425	CYS	0		
426	SER	0		
427	VAL	0		
428	MET	0	ligação de FcRn	
429	HIS	0		
430	GLU	14		
431	ALA	22		
432	LEU	1		
433	HIS	227	ligação de Proteína A	
434	ASN	126	ligação de Proteína A, FcRn	
435	HIS	28		
436	TYR	54		
437	THR	36		
438	GLN	82		
439	LYS	12		
440	SER	62		
441	LEU	2		
442	SER	34		
443	LEU	101		
444	SER	70	Dímero	

Tabela 7. Acessibilidade de superfície de resíduos de aminoácido em cadeia leve capa humana. A acessibilidade de superfície foi calculada usando Surface Racer 5.0 e é expressa como Angstrom ao quadrado [Å²]. "Sítios selecionados" indicam os sítios selecionados para substituição para Cys na invenção.

número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å ²]	Sítios selecionados	Número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å ²]	Sítios selecionados
107	LYS	90	LC-K107C	161	GLU	66	LC-E161C
108	ARG	49	LC-R108C	162	SER	8	
109	THR	148	LC-T109C	163	VAL	14	
110	VAL	77		164	THR	5	
111	ALA	16		165	GLU	74	LC-E165C
112	ALA	50	LC-A112C	166	GLN	8	
113	PRO	2		167	ASP	13	
114	SER	39	LC-S114C	168	SER	170	LC-S168C
115	VAL	0		169	LYS	241	LC-K169C
116	PHE	0		170	ASP	48	LC-D170C
117	ILE	0		171	SER	1	
118	PHE	0		172	THR	0	
119	PRO	0		173	TYR	0	
120	PRO	0		174	SER	0	
121	SER	0		175	LEU	0	
122	ASP	90	LC-D122C	176	SER	0	
123	GLU	51	LC-E123C	177	SER	0	
124	GLN	0		178	THR	0	
125	LEU	21		179	LEU	0	
126	LYS	230		180	THR	13	
127	SER	101		181	LEU	21	
128	GLY	12		182	SER	59	LC-S182C
129	THR	41	LC-T129C	183	LYS	131	LC-K183C
130	ALA	0		184	ALA	32	
131	SER	0		185	ASP	52	
132	VAL	0		186	TYR	0	
133	VAL	0		187	GLU	77	
134	CYS	0		188	LYS	201	LC-K188C
135	LEU	0		189	HIS	42	
136	LEU	0		190	LYS	167	LC-K190C
137	ASN	5		191	VAL	58	LC-V191C
138	ASN	18		192	TYR	0	

número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Sítios selecionados	Número EU	Resíduo	Acessibilidade de superfície [Å²]	Sítios selecionados
139	PHE	0		193	ALA	0	
140	TYR	0		194	CYS	0	
141	PRO	3		195	GLU	12	
142	ARG	55	LC-R142C	196	VAL	0	
143	GLU	117	LC-E143C	197	THR	38	LC-T197C
144	ALA	7		198	HIS	4	
145	LYS	160	LC-K145C	199	GLN	127	LC-Q199C
146	VAL	11		200	GLY	11	
147	GLN	22		201	LEU	17	
148	TRP	0		202	ARG	343	
149	LYS	48		203	SER	110	LC-S203C
150	VAL	0		204	PRO	69	
151	ASP	59		205	VAL	30	
152	ASN	157	LC-N152C	206	THR	70	LC-T206C
153	ALA	51		207	LYS	44	
154	LEU	117	LC-L154C	208	SER	47	
155	GLN	26		209	PHE	5	
156	SER	122	LC-S156C	210	ASN	44	
157	GLY	114		211	ARG	89	
158	ASN	19		212	GLY	15	
159	SER	22	LC-S159C	213	GLU	107	
160	GLN	36		214	CYS	58	

Exemplo 2. Preparação de anticorpos mutantes trastuzumab Cys.

[00367] Regiões variáveis de codificação de DNA de cadeias leves e pesadas de trastuzumab foram quimicamente sintetizadas e clonadas em dois vetores de expressão de mamíferos, pOG-HC e pOG-LC que contêm regiões constantes de IgG1 humano e cadeia leve capa humana, resultando em dois construtos do tipo selvagem, pOG-trastuzumab HC e pOG-trastuzumab LC, respectivamente. Nos vetores, a expressão de construtos de cadeia leve e pesada de anticorpo em células de mamífero é acionada por um promotor de CMV. Os vetores contêm uma sequência de sinal de 24 aminoácidos sintéticos: MKTFILLLLWVLLLWVIFLLPGATA (SEQ ID NO: 99), no terminal N de cadeia pesada ou cadeia leve para guiar sua secreção

de células de mamífero. A sequência de sinal foi validada para ser eficiente em direcionar secreção de proteína em centenas de proteínas de mamífero em 293 células Freestyle™. Mutagênese direcionada por oligonucleotídeo foi empregada para preparar construções mutantes Cys em trastuzumabe. 88 pares de iniciadores de mutação (Tabela 8) foram quimicamente sintetizados, o que corresponde a 88 sítios de mutação Cys selecionados nas regiões constantes de cadeia pesada IgG1 humana e cadeia leve capa como descrito no Exemplo 1. Os pares de iniciador de mutação de sentido e antissenso foram misturados antes da amplificação de PCR. Reações de PCR foram realizadas usando PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene) com pOG-trastuzumabe HC e pOG-trastuzumabe LC como os modelos. Após reações de PCR, os produtos de PCR foram confirmados em géis de agarose, e tratados com DPN I seguidos por transformação em células DH5a (Klock e outro, (2009) *Methods Mol Biol.* 498:91-103).

[00368] Sequências de 88 construções mutantes Cys foram confirmadas por sequenciamento de DNA. A sequência de aminoácido de tamanho natural de cadeia pesada de trastuzumabe de tipo selvagem é mostrada como SEQ ID NO:1 e aquela da cadeia leve como SEQ ID NO:90. As sequências de proteína codificadas da região constante de 59 construtos mutantes Cys de trastuzumabe HC (SEQ ID NO:2 até SEQ ID NO:60) e 29 construtos mutantes Cys de trastuzumabe LC (SEQ ID NO:61 a SEQ ID NO:89) são mostradas na Tabela 9 e Tabela 10, respectivamente. Resíduos de aminoácido em cadeia pesada IgG1 humana e cadeia leve capa humana são numerados pelo sistema de numeração EU (Edelman e outro, (1969) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 63:78-85).

Tabela 8. Sequências de DNA de iniciadores de mutação usadas para preparar 88 mutações de Cys de cadeias pesadas e leves de IgG1 humano.

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
LC-K107C	LC-CYS-S1	GTGGAGATCTGTGCGAACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTCA	100
	LC-CYS-A1	ACCGTTTCGACAGATCTCCACCTTGGTACCC TGTCGGAAC	101
LC-R108C	LC-CYS-S2	GGAGATCAAATGCACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCT	102
	LC-CYS-A2	GCCACCGTGCATTTGATCTCCACCTTGGTA CCCTGTCCGA	103
LC-T109C	LC-CYS-S3	GATCAAACGATGTGTGGCCGCTCCAGCGT GTTTCATCTTCC	104
	LC-CYS-A3	GCGGCCACACATCGTTTGTCTCCACCTTG GTACCCTGTC	105
LC-A112C	LC-CYS-S4	ACGGTGGCCTGTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGA	106
	LC-CYS-A4	CACGCTGGGACAGGCCACCGTTTCGTTTGT CTCCACCTTG	107
LC-S114C	LC-CYS-S5	GCCGCTCCCTGCGTGTTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCA	108
	LC-CYS-A5	ATGAACACGCAGGGAGCGGCCACCGTTTCG TTTGATCTCCA	109
LC-D122C	LC-CYS-S6	CCCCCAGCTGTGAGCAGCTGAAGAGCGGC ACCGCCAGCGT	110
	LC-CYS-A6	CAGCTGCTCACAGCTGGGGGGGAAGATGA ACACGCTGGGA	111
LC-E123C	LC-CYS-S7	CCCAGCGACTGTCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTG	112
	LC-CYS-A7	TTCAGCTGACAGTCGCTGGGGGGGAAGAT GAACACGCTG	113
LC-T129C	LC-CYS-S10	AGAGCGGCTGTGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAATT	114
	LC-CYS-A10	CACGCTGGCACAGCCGCTCTTCAGCTGCTC GTCGCTGGGG	115
LC-R142C	LC-CYS-S11	TCTACCCCTGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AGGTGGACAA	116
	LC-CYS-A11	TTGGCCTCACAGGGGTAGAAGTTGTTTCAGC AGGCACACCA	117

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
LC-E143C	LC-CYS-S12	TACCCCCGGTGTGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAAC	118
	LC-CYS-A12	ACCTTGGCACACCCGGGGGTAGAAGTTGTTC AGCAGGCACA	119
LC-K145C	LC-CYS-S13	CGGGAGGCCTGCGTGCAGTGGAAAGGTGGA CAACGCCCTGC	120
	LC-CYS-A13	CACTGCACGCAGGCCTCCCGGGGGTAGAA GTTGTTTCAGCA	121
LC-N152C	LC-CYS-S14	AAGGTGGACTGTGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGA	122
	LC-CYS-A14	TGCAGGGCACAGTCCACCTTCCACTGCACC TTGGCCTCCC	123
LC-L154C	LC-CYS-S15	GACAACGCCTGTCAGAGCGGCAACAGCCA GGAGAGCGTCA	124
	LC-CYS-A15	TGCCGCTCTGACAGGCGTTGTCCACCTTCC ACTGCACCTTG	125
LC-S156C	LC-CYS-S16	GCCCTGCAGTGTGGCAACAGCCAGGAGAG CGTCACCGAGCA	126
	LC-CYS-A16	GCTGTTGCCCACTGCAGGGCGTTGTCCAC CTTCCACTGCA	127
LC-S159C	LC-CYS-S18	AGCGGCAACTGTCAGGAGAGCGTCACCGA GCAGGACAGCAA	128
	LC-CYS-A18	CTCTCCTGACAGTTGCCGCTCTGCAGGGCG TTGTCCACCT	129
LC-E161C	LC-CYS-S19	AACAGCCAGTGCAGCGTCACCGAGCAGGA CAGCAAGGACT	130
	LC-CYS-A19	GTGACGCTGCACTGGCTGTTGCCGCTCTGC AGGGCGTTGT	131
LC-E165C	LC-CYS-S20	GAGCGTCACCTGTCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGC	132
	LC-CYS-A20	CTGTCTGACAGGTGACGCTCTCCTGGCTG TTGCCGCTCT	133
LC-S168C	LC-CYS-S21	GAGCAGGACTGCAAGGACTCCACCTACAGC CTGAGCAGCA	134
	LC-CYS-A21	GAGTCCTTGACAGTCTGCTCGGTGACGCTC TCCTGGCTGT	135
LC-K169C	LC-CYS-S22	CAGGACAGCTGTGACTCCACCTACAGCCTG AGCAGCACC	136
	LC-CYS-A22	GTGGAGTCACAGCTGTCCTGCTCGGTGACG CTCTCCTGG	137
LC-D170C	LC-CYS-S23	ACAGCAAGTAGTCCACCTACAGCCTGAGCA	138

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
		GCACCCTGAC	
	LC-CYS-A23	TAGGTGGACTACTTGCTGTCCTGCTCGGTG ACGCTCTCCT	139
LC-S182C	LC-CYS-S24	TGACCCTGTGCAAGGCCGACTACGAGAAGC ATAAGGTGTA	140
	LC-CYS-A24	GTCGGCCTTGACAGGGTCAGGGTGCTGC TCAGGCTGTAG	141
LC-K183C	LC-CYS-S25	GACCCTGAGCTGTGCCGACTACGAGAAGCA TAAGGTGTAC	142
	LC-CYS-A25	TAGTCGGCACAGCTCAGGGTCAGGGTGCT GCTCAGGCTGT	143
LC-K188C	LC-CYS-S26	GACTACGAGTGCCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGAC	144
	LC-CYS-A26	ACCTTATGGCACTCGTAGTCGGCCTTGCTC AGGGTCAGG	145
LC-K190C	LC-CYS-S27	GAGAAGCATTGCGTGTACGCCTGCGAGGT GACCCACCAG	146
	LC-CYS-A27	GCGGTACACGCAATGCTTCTCGTAGTCGGC CTTGCTCAGG	147
LC-V191C	LC-CYS-S28	AGCATAAGTAGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCT	148
	LC-CYS-A28	CAGGCGTACTACTTATGCTTCTCGTAGTCG GCCTTGCTCA	149
LC-T197C	LC-CYS-S29	GCGAGGTGTGTCACCAGGGCCTGTCCAGC CCCGTGACCAA	150
	LC-CYS-A29	CCCTGGTGACACACCTCGCAGGCGTACACC TTATGCTTCT	151
LC-Q199C	LC-CYS-S30	GTGACCCACTGTGGCCTGTCCAGCCCCGT GACCAAGAGCT	152
	LC-CYS-A30	GACAGGCCACAGTGGGTCACCTCGCAGGC GTACACCTTAT	153
LC-S203C	LC-CYS-S31	GGCCTGTCCTGTCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGA	154
	LC-CYS-A31	GTCACGGGACAGGACAGGCCCTGGTGGGT CACCTCGCAGG	155
LC-T206C	LC-CYS-S32	CAGCCCCGTGTGCAAGAGCTTCAACAGGG GCGAGTGCTAA	156
	LC-CYS-A32	AAGCTCTTGACACGGGGCTGGACAGGCC CTGGTGGGTC	157
HC-S117C	HC-CYS-S1	CCGTCTCCTGCGCTAGCACCAAGGGCCCC AGCGTGTTTC	158

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
	HC-CYS-A1	GGTGCTAGCGCAGGAGACGGTGACCAGGG TTCCTTGAC	159
HC-S119C	HC-CYS-S2	TCCTCGGCTTGTACCAAGGGCCCCAGCGTG TTCCCCCTGG	160
	HC-CYS-A2	CCCTTGGTACAAGCCGAGGAGACGGTGAC CAGGGTTCCTT	161
HC-K121C	HC-CYS-S3	CTAGCACCTGTGGCCCCAGCGTGTTCCCCC TGGCCCCCA	162
	HC-CYS-A3	GCTGGGGCCACAGGTGCTAGCCGAGGAGA CGGTGACCAG	163
HC-S124C	HC-CYS-S4	AGGGCCCCTGTGTGTTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGA	164
	HC-CYS-A4	GGGGAACACACAGGGGCCCTTGGTGCTAG CCGAGGAGACG	165
HC-S132C	HC-CYS-S5	CCCCCAGCTGCAAGAGCACCAGCGGCGGC ACAGCCGCCCT	166
	HC-CYS-A5	GGTGCTCTTGCAGCTGGGGGCCAGGGGGA ACACGCTGGGG	167
HC-S134C	HC-CYS-S6	AGCAGCAAGTGTACCAGCGGCGGCACAGC CGCCCTGGGCT	168
	HC-CYS-A6	CCGCTGGTACACTTGCTGCTGGGGGCCAG GGGGAACACG	169
HC-S136C	HC-CYS-S7	AGAGCACCTGTGGCGGCACAGCCGCCCTG GGCTGCCTGGT	170
	HC-CYS-A7	GTGCCGCCACAGGTGCTCTTGCTGCTGGG GGCCAGGGGGA	171
HC-T139C	HC-CYS-S8	AGCGGCGGCTGTGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACT	172
	HC-CYS-A8	CAGGGCGGCACAGCCGCCGCTGGTGCTCT TGCTGCTGGGG	173
HC-E152C	HC-CYS-S9	TACTTCCCCTGTCCCCTGACCGTGTCCCTGG AACAGCGGA	174
	HC-CYS-A9	GGTCACGGGACAGGGGAAGTAGTCCTTCA CCAGGCAGC	175
HC-P153C	HC-CYS-S10	TCCCCGAGTGCGTGACCGTGTCCCTGGAACA GCGGAGCCCT	176
	HC-CYS-A10	CACGGTCACGCACTCGGGGAAGTAGTCCTT CACCAGGCAG	177
HC-T155C	HC-CYS-S11	GAGCCCCTGTGCGTGTCCCTGGAACAGCGG AGCCCTGACCT	178
	HC-CYS-A11	CAGGACACGCACACGGGCTCGGGGAAGTA	179

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
		GTCCTTCACCA	
HC-S157C	HC-CYS-S12	TGACCGTGTGCTGGAACAGCGGAGCCCTG ACCTCCGGCGT	180
	HC-CYS-A12	CTGTTCCAGCACACGGTCACGGGCTCGGG GAAGTAGTCCT	181
HC-T164C	HC-CYS-S13	GGAGCCCTGTGCTCCGGCGTGCACACCTT CCCCGCCGTGCT	182
	HC-CYS-A13	ACGCCGAGCACAGGGCTCCGCTGTTCCA GGACACGGTCA	183
HC-S165C	HC-CYS-S14	CCCTGACCTGTGGCGTGCACACCTTCCCCG CCGTGCTGCA	184
	HC-CYS-A14	TGTGCACGCCACAGGTCAGGGCTCCGCTG TTCCAGGACAC	185
HC-T169C	HC-CYS-S15	GCGTGCCTGCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCT	186
	HC-CYS-A15	GGCGGGGAAGCAGTGCACGCCGAGGTCA GGGCTCCGCTG	187
HC-P171C	HC-CYS-S16	CACACCTTCTGTGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACA	188
	HC-CYS-A16	CAGCACGGCACAGAAGGTGTGCACGCCGG AGGTCAGGGCT	189
HC-L174C	HC-CYS-S17	CCGCCGTGTGTCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGTCCA	190
	HC-CYS-A17	GCTGCTCTGACACACGGCGGGGAAGGTGT GCACGCCGGAG	191
HC-S176C	HC-CYS-S18	TGCTGCAGTGCAGCGGCCTGTACAGCCTGT CCAGCGTGGT	192
	HC-CYS-A18	ACAGGCCGCTGCACTGCAGCACGGCGGGG AAGGTGTGCACG	193
HC-S177C	HC-CYS-S19	CTGCAGAGCTGTGGCCTGTACAGCCTGTCC AGCGTGGTGA	194
	HC-CYS-A19	TACAGGCCACAGCTCTGCAGCACGGCGGG GAAGGTGTGCA	195
HC-P189C	HC-CYS-S21	TGACAGTGTGCAGCAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACAT	196
	HC-CYS-A21	CTGCTGCTGCACACTGTCACCACGCTGGAC AGGCTGTACA	197
HC-S191C	HC-CYS-S22	TGCCAGCTGCAGCCTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAA	198
	HC-CYS-A22	CCCAGGCTGCAGCTGGGCACTGTCACCAC GCTGGACAGGCT	199

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
HC-T195C	HC-CYS-S23	GCCTGGGCTGTCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAA	200
	HC-CYS-A23	GTAGGTCTGACAGCCCAGGCTGCTGCTGG GCACTGTCACCA	201
HC-T197C	HC-CYS-S24	GCACCCAGTGCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCA	202
	HC-CYS-A24	GCAGATGTAGCACTGGGTGCCCAGGCTGC TGCTGGGCACT	203
HC-K205C	HC-CYS-S25	TGAACCACTGTCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGT	204
	HC-CYS-A25	TGTTGCTGGGACAGTGGTTCACGTTGCAGA TGTAGGTCTGG	205
HC-S207C	HC-CYS-S26	ACAAGCCCTGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGC	206
	HC-CYS-A26	CTTGGTGTTCAGGGCTTGTGGTTCACGTT GCAGATGTAG	207
HC-D212C	HC-CYS-S27	ACCAAGGTGTGCAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACA	208
	HC-CYS-A27	CACTCTCTTGCACACCTTGGTGTGCTGGG CTTGTGGTTCA	209
HC-K246C	HC-CYS-S28	TCCCCCCTGTCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGA	210
	HC-CYS-A28	GTCCTTGGGACAGGGGGGAACAGGAACA CGGAGGGTCCG	211
HC-E258C	HC-CYS-S29	AGGACCCCTGCGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAG	212
	HC-CYS-A29	CAGGTCACGCAGGGGTCCTGCTGATCATC AGGGTGCCT	213
HC-E269C	HC-CYS-S30	TGAGCCACTGTGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACG	214
	HC-CYS-A30	CTCTGGGTCACAGTGGCTCACGTCCACCAC CACGCAGGTC	215
HC-K274C	HC-CYS-S32	CCAGAGGTGTGCTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGG	216
	HC-CYS-A32	CCAGTTGAAGCACACCTCTGGGTCCTCGTG GCTCACGTCCA	217
HC-N286C	HC-CYS-S35	GAGGTGCACTGTGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGT	218
	HC-CYS-A35	GGTCTTGGCACAGTGCACCTCCACGCCGTC CACGTACCAGT	219
HC-K288C	HC-CYS-S36	CACAACGCCTGTACCAAGCCCAGAGAGGA	220

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
		GCAGTACAACA	
	HC-CYS-A36	GGCTTGGTACAGGCGTTGTGCACCTCCACG CCGTCCACGT	221
HC-K290C	HC-CYS-S37	GCCAAGACCTGTCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCT	222
	HC-CYS-A37	CTCTCTGGGACAGGTCTTGGCGTTGTGCAC CTCCACGCCGT	223
HC-R292C	HC-CYS-S38	ACCAAGCCCTGTGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGT	224
	HC-CYS-A38	CTGCTCCTCACAGGGCTTGGTCTTGGCGTT GTGCACCTCCA	225
HC-E293C	HC-CYS-S39	CAAGCCCAGATGCGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTG	226
	HC-CYS-A39	GTA CTGCTCGCATCTGGGCTTGGTCTTGGC GTTGTGCACCT	227
HC-E294C	HC-CYS-S40	GCCCAGAGAGTGT CAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGT	228
	HC-CYS-A40	TTGTA CTGACACTCTCTGGGCTTGGTCTTG GCGTTGTGCA	229
HC-K320C	HC-CYS-S41	CAAGGAATACTGCTGCAAGGTCTCCAACAA GGCCCTGCCA	230
	HC-CYS-A41	GACCTTG CAGCAGTATTCCTTGCCGTT CAG CCAGTCCTGGT	231
HC-K322C	HC-CYS-S42	TACAAGTGCTGCGTCTCCAACAAGGCCCTG CCAGCCCCCA	232
	HC-CYS-A42	GTTGGAGACGCAGCACTTGTATTCTTGCC GTT CAGCCAGT	233
HC-K326C	HC-CYS-S43	GGTCTCCA ACTGTGCCCTGCCAGCCCCCAT CGAAAAGACC	234
	HC-CYS-A43	GGCAGGGCACAGTTGGAGACCTTGCACTTG TATTCCTTGC	235
HC-A330C	HC-CYS-S44	GCCCTGCCATGTCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCA	236
	HC-CYS-A44	TTCGATGGGACATGGCAGGGCCTTGTGGGA GACCTTGCACT	237
HC-E333C	HC-CYS-S45	GCCCCATCTGCAAGACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGC	238
	HC-CYS-A45	GATGGTCTTG CAGATGGGGGCTGGCAGGG CCTTGTTGGAGA	239
HC-K334C	HC-CYS-S46	CCCATCGAATGCACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCA	240

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
	HC-CYS-A46	GCTGATGGTGCATTCGATGGGGGCTGGCA GGGCCTTGTG	241
HC-T335C	HC-CYS-S47	TCGAAAAGTGCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGA	242
	HC-CYS-A47	CTTGCTGATGCACCTTTTCGATGGGGGCTGG CAGGGCCTTGT	243
HC-S337C	HC-CYS-S48	AGACCATCTGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCA	244
	HC-CYS-A48	CCTTGGCCTTGCAGATGGTCTTTTCGATGG GGGCTGGCAGG	245
HC-R344C	HC-CYS-S50	GGCCAGCCATGCGAGCCCCAGGTGTACAC CCTGCCTCCAT	246
	HC-CYS-A50	CTGGGGCTCGCATGGCTGGCCCTTGGCCT TGCTGATGGTCT	247
HC-R355C	HC-CYS-S51	CTCCATCCTGCGACGAGCTGACCAAGAACC AGGTGTCCCT	248
	HC-CYS-A51	CAGCTCGTCGCAGGATGGAGGCAGGGTGT ACACCTGGGGCT	249
HC-K360C	HC-CYS-S52	AGCTGACCTGCAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGA	250
	HC-CYS-A52	CACCTGGTTGCAGGTCAGCTCGTCCCGGG ATGGAGGCAGG	251
HC-Q362C	HC-CYS-S53	CCAAGAACTGCGTGTCCCTGACCTGTCTGG TGAAGGGCTT	252
	HC-CYS-A53	TCAGGGACACGCAGTTCTTGGTCAGCTCGT CCCGGGATGGA	253
HC-S375C	HC-CYS-S54	TTTACCCTGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACG	254
	HC-CYS-A54	GGCGATGTCGCAGGGGTAGAAGCCCTTCA CCAGACAGGTCA	255
HC-E382C	HC-CYS-S55	TGGAGTGGTGCAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAATACTACA	256
	HC-CYS-A55	GGCCGTTGCTGCACCACTCCACGGCGATGT CGCTGGGGTAG	257
HC-N389C	HC-CYS-S56	AGCCCGAGTGCACACTACAAGACCACCCCCC CAGTGCTGGA	258
	HC-CYS-A56	CTTGATGTTGCACTCGGGCTGGCCGTTGCT CTCCCACTCCA	259
HC-N390C	HC-CYS-S57	CCCGAGAAGTGTACAAGACCACCCCCCA GTGCTGGACA	260
	HC-CYS-A57	GGTCTTGTAGCAGTTCTCGGGCTGGCCGTT	261

Sítios de mutação	Nome do Iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
		GCTCTCCCACT	
HC-K392C	HC-CYS-S58	GAACAACACTACTGCACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGAC	262
	HC-CYS-A58	GGGGTGGTGCAGTAGTTGTTCTCGGGCTG GCCGTTGCTCT	263
HC-T393C	HC-CYS-S59	AACTACAAGTGTACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCA	264
	HC-CYS-A59	TGGGGGGGTACACTTGTAGTTGTTCTCGGG CTGGCCGTTG	265
HC-L398C	HC-CYS-S60	CCCCAGTGTGTGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACA	266
	HC-CYS-A60	GTCGCTGTCACACACTGGGGGGGTGGTCTT GTAGTTGTTCT	267
HC-S400C	HC-CYS-S61	TGCTGGACTGCGACGGCAGCTTCTCCTGT ACAGCAAGCT	268
	HC-CYS-A61	GCTGCCGTGCGAGTCCAGCACTGGGGGGG TGGTCTTGTAGT	269
HC-D413C	HC-CYS-S62	TGACCGTGTGCAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGT	270
	HC-CYS-A62	ACCTGGACTTGCACACGGTCAGCTTGCTGT ACAGGAAGAAG	271
HC-S415C	HC-CYS-S63	TGGACAAGTGCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTTACAGCT	272
	HC-CYS-A63	CTGCCACCTGCACCTTGTCCACGGTCAGCTT GCTGTACAGG	273
HC-V422C	HC-CYS-S64	AGGGCAACTGCTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCT	274
	HC-CYS-A64	GCAGCTGAAGCAGTTGCCCTGCTGCCACCT GGACTTGTCCA	275

Tabela 9. Sequências de aminoácido da região constante de construções mutantes Cys em cadeia pesada de IgG1 humano. SEQ ID NO:1 é a sequência para trastuzumabe de tamanho natural (IgG1 humano). SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:60 indicam os números ID de sequência para 59 construções mutantes Cys em cadeia pesada IgG1 humano, mostrando apenas as sequências da região constante.

SEQ ID NO:1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:2

CASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:3

SACTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:4

SASTCGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:5 SASTKGPCVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:6 SASTKGPSVFPLAPSCCKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:7 SASTKGPSVFPLAPSSKCTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:8 SASTKGPSVFPLAPSSKSTCGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

<p>SEQ ID NO:9</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGCAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:10</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:11</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPECVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:12</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVCVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

SEQ ID NO:13 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVCWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:14 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALCSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:15 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTTCGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:16 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHCF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO:17 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF CAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:18 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVCQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:19 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQCSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:20 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSCGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO:21

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVCSSTLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:22

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:23

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGCQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:24

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQCYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:25 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:26 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPCNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:27 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVCKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:28 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPCPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO:29 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPCVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:30 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHCDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:31 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVCFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:32 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHCAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

<p>SEQ ID NO:33</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:34</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTCPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:35</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:36</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPRCEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

SEQ ID NO:37 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPRECQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:38 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:39 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCCVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:40 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO:41

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:42

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
CKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:43

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
ECTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:44

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKCISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

<p>SEQ ID NO:45</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTICKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:46</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPCPEPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:47</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSCEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:48</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:49</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNCVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:50</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:51</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWCSNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:52</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PECNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:53</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:54</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYCTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:55</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKCTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:56</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVCDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

SEQ ID NO:57 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:58 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVCKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:59 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKCRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:60 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO 290:

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
ECTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO: 291

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
ECTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYCTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO: 292

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
ECTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO: 293

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
ECTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYCTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

<p>SEQ ID NO: 294</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI E<u>C</u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC<u>D</u>IAVEWESNGQ PENNY<u>C</u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 295</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP<u>C</u>PVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC<u>D</u>IAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

Tabela 10, Sequências de aminoácido da região constante de 29 construções mutantes de Cys de cadeia leve capa humana. SEQ ID NO:61 é a sequência da região constante de cadeia leve capa humana do tipo selvagem. SEQ ID NO: 62 a SEQ ID NO:90 indicam os números ID de sequência para 29 construções mutantes Cys na região constante de cadeia leve capa humana.

<p>SEQ ID NO:61</p> <p>CRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO:62</p> <p>KCTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO:63</p> <p>KRCVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

SEQ ID NO:64 KRTVACPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:65 KRTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:66 KRTVAAPSVFIFPPSCEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:67 KRTVAAPSVFIFPPSDCQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:68 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGCASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:69 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPCEAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:70 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRCAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:71 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREACVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:72 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDCALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:73 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNACQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:74 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQCGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:75 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNCQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:76 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQCSVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:77 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTC QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:78 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDCKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:79 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSCDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:80 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKCDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:81 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLCADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:82 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:83 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEECHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:84 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHCVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:85 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKCYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:86 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVCHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:87 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHCGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:88 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSCPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:89 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVCKSFNRGEC

SEQ ID NO:90 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Exemplo 3. Transferência das mutações de Cys de cadeia pesada e cadeia leve de trastuzumabe para diferentes anticorpos.

[00369] Para trastuzumabe, todas as mutações Cys para a ligação de cargas úteis de fármaco foram escolhidas serem na região constante de sua cadeia pesada humana e leve capa humana de IgG1. Por que regiões constantes de anticorpos são altamente conservadas em sequência e estrutura primária, resíduos mutantes de Cys que são identificados como bons sítios de ligação de carga útil no contexto de trastuzumabe servirá também como resíduos de ligação preferidos em outros anticorpos. Para demonstrar a capacidade de transferência destes sítios de conjugação genérica para outros anticorpos, clonamos um grupo de mutações Cys em anticorpo 14090, O anticorpo 14090 é um anticorpo com a cadeia pesada IgG1 humana e uma cadeia leve lambda humana que se liga a uma proteína alvo diferente do trastuzumabe. O DNA codificando região variável de anticorpo 14090 foi clonado em sete construções de plasmídeo mutante de Cys de pOG trastuzumabe HC selecionadas (SEQ ID NO listada na Tabela 11) para substituir as regiões variáveis de construções de trastuzumabe nos plasmídeos como descrito no Exemplo 2. Como resultado, as sequências de aminoácido das regiões constantes de cadeia pesada em correspondentes sete construções de Cys de anticorpo 14090 e trastuzumabe são idênticas (FIG. 3). Subseqüentes exemplos mostram que estes sítios podem ser facilmente conjugados. Ao contrário, devido a um alto grau de similaridade em sequências primárias e em estruturas terciárias para diferentes isótipos de IgG humano (FIG. 4), mutações de Cys na cadeia leve capa de trastuzumabe podem facilmente ser transferidas

para equivalentes cadeias leves em anticorpos humanos contendo diferentes cadeias pesadas de isótipo. Da mesma maneira, os sítios identificados na região constante de IgG1 podem ser transferidos para IgG2, IgG3 e IgG4.

Exemplo 4. Mutações de Cisteína em cadeia leve lambda humana.

[00370] Cadeias leves Capa e lambda humanas têm pequena similaridade de sequência de aminoácido (FIG. 5A). Mutações na cadeia leve lambda de anticorpo 14090 foram selecionadas com base na similaridade aproximada das localizações dos resíduos em um modelo de estrutura cristal de proteína (Protein Databank structure entry 3G6D.pdb) de uma Fab contendo a cadeia leve lambda humana em referência aos resíduos desejáveis na cadeia leve capa de trastuzumabe (FIG. 5 A e B). Sete Cys mutantes de construções adicionais foram geradas em plasmídeo de cadeia leve lambda de anticorpo 14090 usando mutagênese direcionada ao oligonucleotídeo (Higuchi *et al.* 1988) em combinação com estratégia de clonagem de PIPE (Klock e Lesley, 2009). Os iniciadores de mutação usados para gerar mutações de ponto de Cys na cadeia leve lambda são listados na Tabela 12. A secreção de anticorpo 14090 é também direcionada pela sequência sinal de aminoácido 24 sintética: MKTFILLLLWVLLLWVIFLLPGATA (SEQ ID NO: 99). Sequências de construções Cys de anticorpo 14090 foram confirmadas por sequenciamento de DNA. A sequência para uma região constante de cadeia leve lambda do tipo selvagem humana é mostrada como SEQ ID NO:91. As sequências de proteína codificadas de sete construções mutantes Cys na cadeia leve (SEQ ID NO:92 a SEQ ID NO:98) são mostradas na Tabela 13. Subseqüentes exemplos mostrarão que estes mutantes de Cys são eficientemente conjugados com uma carga útil de ADC. Por que todos estes mutantes são na região constante da cadeia leve lambda humana, estes sítios de conjugação podem

facilmente ser transferidos para outros anticorpos com cadeias leves lambda.

Tabela 11. Números ID de sequência de construções Cys de cadeia pesada de trastuzumabe usadas para clonagem da região variável de anticorpo 14090.

Sequence ID NO: de construção Cys de HC de trastuzumabe
SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 48
SEQ ID NO: 50

Tabela 12. Sequências de nucleotídeo de iniciadores usados em mutagênese de sete construções mutantes Cys em cadeia leve lambda de IgG1 humano.

Sítios de mutação	Nome do iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
LC-A143C	Seq-0017	CCGGGATGCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCA GATAGC	276
	Seq-0018	TGTCACGCATCCCGGGTAGAAGTCACTTATG AGACA	277
LC-T145C	Seq-0019	GCCGTGTGTGTGGCCTGGAAGGCAGATAGC AGCCCC	278
	Seq-0020	GGCCACACACACGGCTCCCGGGTAGAAGTC ACTTAT	279
LC-A147C	Seq-0021	ACAGTGTGTTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC GTCAAG	280
	Seq-0022	CTTCCAACACACTGTACGGCTCCCGGGTA GAAGTC	281
LC-K156C	Seq-0023	CCCGTCTGTGCGGGAGTGGAGACCACCACA CCCTCC	282
	Seq-0024	TCCCGCACAGACGGGGCTGCTATCTGCCTT CCAGGC	283

Sítios de mutação	Nome do iniciador	Sequência	SEQ ID NO.
LC-V159C	Seq-0025	GCGGGATGTGAGACCACCACACCCTCCAAA CAAAGC	284
	Seq-0026	GGTCTCACATCCCGCCTTGACGGGGCTGCT ATCTGC	285
LC-T163C	Seq-0027	ACCACCTGTCCCTCCAAACAAAGCAACAACA AGTAC	286
	Seq-0028	GGAGGGACAGGTGGTCTCCACTCCCGCCTT GACGGG	287
LC-S168C	Seq-0029	AAACAATGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCA GCTAT	288
	Seq-0030	GTTGTTGCATTGTTGGAGGGTGTGGTGGTC TCCAC	289

Tabela 13. Sequência de aminoácido da região constante de construções mutantes Cys em cadeia leve lambda de anticorpo 14090. A SEQ ID NO:91 é a sequência para a região constante de cadeia leve lambda humana tipo selvagem. SEQ ID NO:91 a SEQ ID NO:98 indicam as sequências dos 7 mutantes de Cys na região constante de cadeia leve lambda humana de anticorpo 14090.

SEQ ID NO:91 QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:92 QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGCVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:93 QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVCVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS

<p>SEQ ID NO:94</p> <p>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVCWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>
<p>SEQ ID NO:95</p> <p>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVCAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>
<p>SEQ ID NO:96</p> <p>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGCETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>
<p>SEQ ID NO:97</p> <p>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTCPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>
<p>SEQ ID NO:98</p> <p>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQCNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>

Exemplo 5. Expressão e purificação de anticorpos mutantes de Cys em 293 células Freestyle™.

[00371] Mutantes de Cys do anticorpo de trastuzumabe foram expressos em 293 células Freestyle™ por cotransfecção de plasmídeos de cadeia leve e cadeia pesada usando método de transfecção transitória como previamente descrito (Meissner, *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 75:197-203 (2001)). Os plasmídeos de DNA usados em cotransfecção foram preparados usando o kit de preparação de plasmídeo Qiagen de acordo com o protocolo do fabricante. Células 293 Freestyle™ foram cultivadas em suspensão

em meio de expressão Freestyle™ (Invitrogen) a 37°C sob 5% de CO₂. No dia anterior à transfecção, as células foram divididas para 0,7 x 10⁶ células/ml em meio fresco. No dia de transfecção, a densidade celular tipicamente atingiu 1,5 x 10⁶ células/ml. As células foram transfectadas com uma mistura de plasmídeos de cadeia pesada e cadeia leve na relação de 1:1 usando o método PEI (Meissner *et al.*, 2001). As células transfectadas foram também cultivadas durante cinco dias. O meio da cultura foi colhido por centrifugação da cultura a 2000x g durante 20 min e filtrado por meio de filtros de 0,2 micrômetros. Os anticorpos expressos foram purificados do meio filtrado usando Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare Life Sciences). IgGs de anticorpo foram eluídos de uma coluna Protein A-Sepharose™ pelo tampão de eluição (pH 3.0) e imediatamente neutralizados com Tris-HCl a 1 M (pH 8,0) seguido por uma permuta de tampão para PBS.

[00372] Os níveis de expressão de 88 anticorpos mutantes de trastuzumabe de Cys em transitoriamente transfectadas 293 Freestyle™ são similares àqueles de trastuzumabe tipo selvagem, com uma produção média a 18,6 mg/L +/- 9,5 mg/L (Tabela 14), sugerindo que mutações de ponto simples nos sítios selecionados não alteraram significativamente a retenção do anticorpo expresso pelo mecanismo de secreção de células. A análise dos anticorpos mutantes de Cys de trastuzumabe purificados usando SDS PAGE de não redução indica que os anticorpos mutantes de Cys não formaram oligômeros ligados a dissulfeto pelas cisteínas construídas (FIG. 6). Cromatografia por exclusão de tamanho (FIG. 7) também suportou a conclusão de que todos os anticorpos de trastuzumabe mutante de Cys são monoméricos. Análise de fase reversa de HPLC dos anticorpos mutantes também sugere que a maioria dos anticorpos mutantes de Cys é indistinguível de trastuzumabe do tipo selvagem em termos de tempo de retenção e homogeneidade (FIG. 8). Análise

de LC-R108C de trastuzumabe de tamanho natural desglicosilado não reduzido por espectrometria de massa (LC-MS intacta) revelou que a maior parte do anticorpo foi modificada por duas cisteínas (FIG. 9 e Tabela 15). Estas observações são consistentes com uma publicação prévia indicando que o grupo tiol da cisteína construída nos anticorpos mutantes de Cys de trastuzumabe é modificado por cisteína quando expresso em células 293 freestyle™, e que a modificação necessita ser removida reduzindo os reagentes antes da conjugação com quaisquer reagentes reativos de tiol (Chen, *et al.*, *mAbs* 1:6, 563-571, 2009).

[00373] Os mutantes de Cys de anticorpo 14090 foram também expressos em células 293 Freestyle™ cotransfectando plasmídeos de HC e LC usando o método PEI como descrito (Meissner *et al.*, 2001). Os níveis de expressão dos mutantes de Cys de anticorpo 14090 são similares àquele do anticorpo 14090 tipo selvagem (Tabela 16).

Tabela 14. Produção de anticorpos mutantes de Cys de trastuzumabe transitoriamente expressos em células 293 Freestyle™. As produções foram medidas por absorção de UV a 280 nm após purificação de Proteína A.

mutante de Cys de transtuzumabe	Ab Purificado (mg/L)	mutante de Cys de transtuzumabe	Ab Purificado (mg/L)
HC-S117C	46,9	HC-R355C	30,1
HC-S119C	22,5	HC-K360C	32,0
HC-K121C	22,1	HC-Q362C	20,7
HC-S124C	17,8	HC-S375C	33,3
HC-S132C	30,9	HC-E382C	35,3
HC-S134C	18,6	HC-N389C	28,7
HC-S136C	21,2	HC-N390C	34,5
HC-T139C	25,9	HC-K392C	28,2
HC-E152C	13,0	HC-T393C	6,6
HC-P153C	10,8	HC-L398C	5,1
HC-T155C	18,4	HC-S400C	4,1

mutante de Cys de trastuzumabe	Ab Purificado (mg/L)	mutante de Cys de trastuzumabe	Ab Purificado (mg/L)
HC-S157C	16,9	HC-D413C	27,6
HC-T164C	20,2	HC-S415C	10,6
HC-S165C	20,6	HC-V422C	5,0
HC-T169C	8,2	LC-K107C	11,0
HC-P171C	24,6	LC-R108C	27,0
HC-L174C	15,2	LC-T109C	13,1
HC-S176C	13,4	LC-A112C	10,5
HC-S177C	30,0	LC-S114C	21,2
HC-P189C	11,7	LC-D122C	25,5
HC-K205C	13,3	LC-E123C	20,1
HC-S207C	2,5	LC-T129C	7,1
HC-D212C	26,5	LC-R142C	14,6
HC-K246C	12,0	LC-E143C	10,0
HC-E258C	18,7	LC-K145C	13,0
HC-E269C	6,3	LC-N152C	12,0
HC-K273C	20,7	LC-L154C	13,1
HC-N286C	15,0	LC-S156C	12,0
HC-K288C	20,9	LC-S159C	26,6
HC-K290C	20,0	LC-E161C	20,0
HC-R292C	21,0	LC-E165C	5,0
HC-E293C	31,2	LC-S168C	12,0
HC-E294C	37,5	LC-K169C	4,0
HC-K320C	23,6	LC-D170C	5,0
HC-K322C	35,1	LC-S182C	8,8
HC-K326C	28,0	LC-K183C	12,6
HC-A330C	27,1	LC-K188C	12,0
HC-E333C	10,3	LC-K190C	5,2
HC-K334C	14,0	LC-V191C	29,9
HC-T335C	7,0	LC-T197C	19,0
HC-S337C	6,9	LC-Q199C	16,8
HC-R344C	32,6	LC-S203C	26,2
		LC-T206C	27,8

Tabela 15. Massa teórica e observada para anticorpo de LC-R108C de trastuzumabe após purificação de células 293 Freestyle™.

Espécies de anticorpo		Massa teórica (Da)	Massa observada (Da)
LC-R108C		145063	145071
Aduto de LC-R108C-Cys	+1 Cys	145181	145189
Aduto duplo de LC-R108C-Cys	+2 Cys	145299	145311

Tabela 16: Produção de mutantes Cys de anticorpo 14090

transitoriamente expressos em células 293 Freestyle™.

Mutante de Cys de anticorpo 14090	Produção de Ab (mg/L)
HC-S124C	4,72
HC-S136C	3,64
HC-T139C	4,59
HC-E152C	2,93
HC-L174C	5,26
HC-E258C	5,86
HC-K360C	4,86
LC-A143C	4,63
LC-T145C	6,98
LC-A147C	8,37
LC-K156C	5,74
LC-V159C	9,67
LC-T163C	9,98
LC-S168C	5,61

Exemplo 6. Redução, reoxidação e conjugação de anticorpos mutantes de Cys com MC-MMAF.

[00374] Porque Cys construída em anticorpos expressos em células mamíferas são modificados por adutos (dissulfetos) tal como glutathiona (GSH) e/ou cisteína durante sua biossíntese (Chen *et al.* 2009), a Cys modificada no produto como inicialmente expressa é não reativa aos reagentes reativos de tiol, tais como grupos maleimido ou bromo- ou iodo-acetamida. Para conjugar a cisteína construída após a expressão, os adutos de glutathiona ou cisteína necessitam ser reduzidos reduzindo estes dissulfetos, o que geralmente envolve reduzir todos os dissulfetos na proteína exopressa. Isto pode ser realizado primeiro expondo o anticorpo a um agente de redução, tal como ditioneitol (DTT) seguido por um procedimento que permite a reoxidação de

todas as ligações de dissulfeto nativas do anticorpo para restaurar e/ou estabilizar a estrutura de anticorpo funcional. Conseqüentemente, a fim de reduzir todas as ligações de dissulfeto nativas e a ligação de dissulfeto entre os adutos de cisteína ou GSH do resíduo de cisteína construída, recentemente preparado DTT foi adicionado a mutantes de Cys previamente purificados de trastuzumabe e anticorpo 14090, para uma concentração final de 20 mM. Após a incubação do anticorpo com DTT a 37°C durante 1 hora, as misturas foram dialisadas a 4°C junto a PBS durante três dias com troca de tampão diariamente para remover DTT e reoxidar as ligações de dissulfeto nativas. Um método alternativo é remover os reagentes de redução através de uma coluna de dessalinização, Sephadex G-25. Assim que a proteína é totalmente reduzida, ascorbato oxidado a 1 mM (ácido desidro-ascórbico) é adicionado às amostras dessalinizadas e as incubações de reoxidação são realizadas durante 20 horas. Ambos os métodos têm produzido resultados similares. Entretanto, tentativas de seguir os protocolos de reoxidação previamente descritos na literatura usando CuSO_4 resultou em precipitação de proteína. Todos os exemplos aqui empregam o protocolo de diálise descrito acima. A reoxidação restaura dissulfetos intra-cadeia, enquanto que a diálise permite cisteínas e glutathionas conectadas à(s) cisteína(s) recentemente introduzida(s) dializarem.

[00375] Após reoxidação, os anticorpos são prontos para conjugação. Maleimida-MMAF (MC-MMAF, 10 equivalentes relativos ao anticorpo, FIG. 10) foi adicionado para reoxidar anticorpos em tampão de PBS (pH 7,2). As incubações foram realizadas em 1 hora a 24 horas. O processo de conjugação foi monitorado por HPLC de fase reversa, que é capaz de separar os anticorpos conjugados daqueles não conjugados. As misturas de reação de conjugação foram analisadas em uma coluna PRLP-S 4000A (50 mm x 2.1 mm, Agilent) aquecida para 80°C e a eluição da coluna foi realizada por um

gradiente linear de 30 a 60% de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. A eluição de proteínas da coluna foi monitorada a 280 nm, 254 nm e 215 nm. O traço de HPLC de fase reversa de uma mistura de conjugação típica é mostrado na FIG. 11.

[00376] Quando as misturas de conjugação foram analisadas por HPLC de fase reversa, muitos sítios de Cys geraram produtos de conjugação homogênea, como sugerido por perfis de eluição de pico simples, uniformes (FIG. 11), enquanto que alguns sítios de Cys geraram produtos de conjugação heterogênea (FIG. 12). Os procedimentos descritos acima envolvem a redução e reoxidação de ligações de dissulfeto nativas, bem como a redução de ligações entre os adutos de cisteína e GSH dos resíduos de cisteína construída. Durante o processo de reoxidação, o resíduo de cisteína construída pode interferir com a reforma das ligações de dissulfeto nativas apropriadas por meio de um processo de emaranhamento de dissulfeto. Isto pode levar à formação de ligações de dissulfeto pareadas erroneamente, ou entre a cisteína construída e um resíduo de cisteína nativa ou entre ligações de dissulfeto nativas incorretamente pareadas. Tais ligações de dissulfeto incorretamente pareadas podem afetar a retenção do anticorpo na coluna de HPLC de fase reversa. O processo de pareamento incorreto pode também resultar em resíduos de cisteína não pareados, exceto a cisteína construída desejada. Ligação da maleimida-MMAF a diferentes posições no anticorpo afeta o tempo de retenção diferentemente (veja discussão de ADCs homogeneamente conjugadas abaixo). Além disso, reoxidação incompleta deixará o anticorpo com resíduos de cisteína nativa que reagirão com maleimida-MMAF além da conjugação desejada com o resíduo de cisteína construída. Qualquer processo que impede a apropriada e completa formação das ligações

de dissulfeto nativas resultará em um perfil de HPLC complexo (FIG. 11) em conjugação a Maleimida-MMAF. A produção da ADC uniforme como medido por absorção de UV das misturas de reação não purificadas, variou dependendo das mutações de Cys (Tabela 17). Usando o protocolo de redução/reoxidação e procedimentos de conjugação descritos acima 65 dos 88 anticorpos de trastuzumabe mutantes de Cys resultaram em produtos de conjugação homogêneos e estes sítios são sítios vantajosos para substituições de Cys a serem feitas quando preparando anticorpos construídos de cisteína para conjugação.

[00377] Estas 65 ADCs de Cys-MMAF foram analisadas em detalhes em vários ensaios: Fluorimetria de varredura diferencial (DSF) foi usada para medir a estabilidade térmica. Cromatografia por exclusão de tamanho analítica (AnSEC) foi usada para medir a agregação. A potência de morte celular dependente de antígeno *in vitro* foi medida por ensaios de viabilidade celular e o comportamento de farmacocinéticos foi medido em camundongos. Estes ensaios e os resultados respectivos são descritos em maiores detalhes abaixo.

[00378] Para avaliar o estado de agregação de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe, os ADCs foram analisadas em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (GE, Superdex 200, 3.2/30) em uma taxa de fluxo de 0,1 ml/min em PBS. Todas as 65 ADCs de Cys-MMAF foram monoméricas. A maioria das ADCs contém menos do que 10% de oligômero (FIG. 13, Tabela 18), indicando que a conjugação de MC-MMAF a construções mutantes de Cys de trastuzumabe nos sítios selecionados não causaram agregação do anticorpo.

Tabela 17. Produção de ADCs de MMAF geradas com construções mutantes de Cys de trastuzumabe. “Hetero” indica uma mistura heterogênea de espécies mostradas em HPLC de fase reversa com diferentes tempos de retenção.

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	Produção (mg/L)	Construção de Cys	Produção (mg/L)
HC-S117C	6,9	HC-R344C	33,4
HC-S119C	15,3	HC-R355C	24,3
HC-K121C	4,4	HC-K360C	26,5
HC-S124C	13,2	HC-Q362C	hetero
HC-S132C	Hetero	HC-S375C	34,3
HC-S134C	Hetero	HC-E382C	34,9
HC-S136C	Hetero	HC-N389C	hetero
HC-T139C	11,1	HC-N390C	33,1
HC-E152C	7,8	HC-K392C	20,8
HC-P153C	8,2	HC-T393C	hetero
HC-T155C	12,9	HC-L398C	3,4
HC-S157C	13,5	HC-S400C	1,7
HC-T164C	13,7	HC-D413C	hetero
HC-S165C	Hetero	HC-S415C	hetero
HC-T169C	4,7	HC-V422C	3,6
HC-P171C	14,7	LC-K107C	1,6
HC-L174C	9,1	LC-R108C	12,2
HC-S176C	Hetero	LC-T109C	8,4
HC-S177C	Hetero	LC-A112C	hetero
HC-P189C	7,7	LC-S114C	16,9
HC-S191C	Hetero	LC-D122C	Hetero
HC-T195C	Hetero	LC-E123C	Hetero
HC-T197C	Hetero	LC-T129C	4,0
HC-K205C	11,3	LC-R142C	11,3
HC-S207C	1,0	LC-E143C	4,0
HC-D212C	Hetero	LC-K145C	8,7
HC-K246C	9,0	LC-N152C	7,2
HC-E258C	10,1	LC-L154C	1,3
HC-E269C	5,6	LC-S156C	7,2
HC-K274C	15,3	LC-S159C	12,3
HC-N286C	12,9	LC-E161C	12,0

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	Produção (mg/L)	Construção de Cys	Produção (mg/L)
HC-K288C	14,4	LC-E165C	2,0
HC-K290C	8,0	LC-S168C	3,1
HC-R292C	10,3	LC-K169C	2,5
HC-E293C	15,0	LC-D170C	2,2
HC-E294C	Hetero	LC-S182C	7,9
HC-K320C	18,9	LC-K183C	3,8
HC-K322C	29,1	LC-K188C	7,2
HC-K326C	22,8	LC-K190C	Hetero
HC-A330C	Hetero	LC-V191C	Hetero
HC-E333C	7,4	LC-T197C	16,4
HC-K334C	11,2	LC-Q199C	10,3
HC-T335C	5,2	LC-S203C	13,5
HC-S337C	1,4	LC-T206C	Hetero

Tabela 18. Percentagem de oligômero em preparações de ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe como determinado por cromatografia por exclusão de tamanho analítica.

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	Oligômero (%)	Sítio de conjugação	Oligômero (%)
HC-S117C	b.d.	HC-R344C	9.5
HC-S119C	3,2	HC-R355C	b.d.
HC-K121C	b.d.	HC-K360C	b.d.
HC-S124C	b.d.	HC-S375C	b.d.
HC-T139C	4.8	HC-E382C	b.d.
HC-E152C	b.d.	HC-N390C	b.d.
HC-P153C	b.d.	HC-K392C	b.d.
HC-T155C	b.d.	HC-L398C	b.d.
HC-S157C	b.d.	HC-S400C	9,2
HC-T164C	b.d.	HC-V422C	b.d.
HC-T169C	b.d.	LC-K107C	b.d.
HC-P171C	b.d.	LC-R108C	b.d.
HC-L174C	b.d.	LC-T109C	b.d.
HC-P189C	b.d.	LC-S114C	b.d.
HC-K205C	b.d.	LC-T129C	b.d.
HC-S207C	b.d.	LC-R142C	b.d.
HC-K246C	b.d.	LC-E143C	13.1

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	Oligômero (%)	Sítio de conjugação	Oligômero (%)
HC-E258C	b.d.	LC-K145C	b.d.
HC-E269C	b.d.	LC-N152C	b.d.
HC-K274C	11,7	LC-L154C	7,3
HC-N286C	9,2	LC-S156C	6,1
HC-K288C	b.d.	LC-S159C	2,8
HC-K290C	b.d.	LC-E161C	b.d.
HC-R292C	b.d.	LC-E165C	b.d.
HC-E293C	b.d.	LC-S168C	b.d.
HC-K320C	b.d.	LC-K169C	b.d.
HC-K322C	b.d.	LC-D170C	b.d.
HC-K326C	b.d.	LC-S182C	6.9
HC-E333C	b.d.	LC-K183C	b.d.
HC-K334C	b.d.	LC-K188C	b.d.
HC-T335C	b.d.	LC-T197C	b.d.
HC-S337C	b.d.	LC-Q199C	6.3
		LC-S203C	b.d.

b.d.: abaixo do limite de detecção.

Exemplo 7. Ensaio de estabilidade térmica *in vitro* de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe.

[00379] Conjugação de carga útil de MMAF a trastuzumabe pode estabilizar ou desestabilizar o anticorpo, levando a mudanças em temperatura de fusão do anticorpo, o que pode ser determinado por fluorimetria de varredura diferencial (DSF) que é com base em desnaturação induzida pela temperatura monitorada por um pigmento ambiental, tal como laranja sypro. Amostras de ADC foram aliqüotadas em triplicata para placas de 384 cavidades em PBS (fosfato de sódio a 6,7 mM pH 7,2; NaCl a 150 mM). Em cada cavidade, 8 µl de 0,25 mg/ml de anticorpo foram misturados com 2 µl de pigmento laranja sypro 25x (Invitrogen). As placas foram seladas e analisadas em um sistema Roche LightCycler 480 com uma rampa de temperatura de 30 a 85°C com 20 varreduras de fluorescência registradas por grau C. Temperaturas de fusão foram determinadas a partir do primeiro

derivado das curvas de intensidade de fluorescência vs. tempo.

[00380] Um ensaio de mudança térmica típica para trastuzumabe tipo selvagem revelou duas transições de fusão (T_m), T_{m1} a 69,7°C e T_{m2} a 81,2°C, respectivamente (Tabela 19). Quando ADC de Cys-MMAF de trastuzumabes foram submetidas a ensaios de estabilidade térmica de proteína, ficou evidente que a conjugação de MC-MMAF aos anticorpos induziu diferentes mudanças em T_m , dependendo dos sítios de conjugação (Tabela 19). Quando MC-MMAF foi conjugado à maioria dos sítios de Cys em domínios de CH1 ou CH3, os ADCs resultantes, por exemplo, HC-K356C-MMAF, mostraram um padrão similar àquele de anti-Her tipo selvagem com pequenas mudanças em T_{m1} e T_{m2} . Entretanto, quando MC-MMAF foi conjugado aos sítios de Cys localizados no domínio de CH2, um decréscimo em T_{m1} foi observado para a maioria dos sítios, enquanto que o T_{m2} permaneceu amplamente inalterado. O decréscimo de T_{m1} observado para a maioria dos conjugados de Cys-MMAF de domínio CH2 variou de 5°C a 26°C. As duas ADCs com o maior decréscimo em T_{m1} são HC-T335C-MMAF e HC-S337C-MMAF, com T_{m1} a 42°C e 45°C, respectivamente (Figura 14). Os resultados indicam que a localização de conjugação de MC-MMAF pode ter um significativo impacto sobre a estabilidade das ADCs.

Tabela 19. Temperaturas de fusão T_{m1} e T_{m2} de ADC de Cys-MMAF de trastuzumabes observada por fluorimetria de varredura diferencial (DSF).

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	domínio de HC	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]
Anticorpo tipo selvagem	n,a,	69,71	81,18
HC-S117C	CH1	69,09	79,85
HC-S119C	CH1	69,28	78,58
HC-K121C	CH1	69,63	78,52
HC-S124C	CH1	69,27	80,56

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	domínio de HC	Tm1 [°C]	Tm2 [°C]
HC-T139C	CH1	69,09	80,74
HC-E152C	CH1	69,63	80,83
HC-P153C	CH1	69,71	78,52
HC-T155C	CH1	69,27	80,83
HC-S157C	CH1	69,72	80,81
HC-T164C	CH1	69,17	80,7
HC-T169C	CH1	68,74	80,47
HC-P171C	CH1	69,27	77,18
HC-L174C	CH1	69,89	80,03
HC-P189C	CH1	69,09	81,27
HC-K205C	CH1	69,54	80,65
HC-S207C	CH1	69,00	80,65
HC-K246C	CH2	64,65	80,74
HC-E258C	CH2	65,32	81,03
HC-E269C	CH2	65,36	81,01
HC-K274C	CH2	67,14	81,09
HC-N286C	CH2	67,22	81,09
HC-K288C	CH2	65,54	80,83
HC-K290C	CH2	69,00	80,65
HC-R292C	CH2	67,49	80,56
HC-E293C	CH2	64,34	81,03
HC-K320C	CH2	60,60	80,59
HC-K322C	CH2	62,41	80,70
HC-K326C	CH2	63,05	80,74
HC-E333C	CH2	63,67	80,92
HC-K334C	CH2	64,65	80,47
HC-T335C	CH2	42,93	80,04
HC-S337C	CH2	45,56	80,48
HC-R344C	CH3	69,50	80,92
HC-R355C	CH3	68,18	81,25
HC-K360C	CH3	69,28	80,92
HC-S375C	CH3	68,20	81,36
HC-E382C	CH3	69,36	80,74
HC-N390C	CH3	68,73	80,92
HC-K392C	CH3	67,05	80,92

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	domínio de HC	Tm1 [°C]	Tm2 [°C]
HC-L398C	CH3	68,47	81,36
HC-S400C	CH3	68,65	81,27
HC-V422C	CH3	69,98	81,45
LC-K107C	n,a,	69,45	80,29
LC-R108C	n,a,	70,10	n,d, ¹
LC-T109C	n,a,	68,47	80,21
LC-T129C	n,a,	68,47	80,12
LC-R142C	n,a,	69,00	78,61
LC-E143C	n,a,	69,83	80,59
LC-K145C	n,a,	69,00	80,65
LC-N152C	n,a,	67,49	81,09
LC-L154C	n,a,	68,47	80,65
LC-S156C	n,a,	68,83	80,47
LC-S159C	n,a,	69,50	79,93
LC-E161C	n,a,	68,65	80,12
LC-E165C	n,a,	69,27	79,76
LC-S168C	n,a,	69,54	79,67
LC-K169C	n,a,	69,09	80,29
LC-D170C	n,a,	68,83	80,12
LC-S182C	n,a	69,18	80,29
LC-K183C	n,a	69,09	80,47
LC-K188C	n,a	68,74	80,65
LC-T197C	n,a	69,63	80,74
LC-Q199C	n,a	69,54	80,21
LC-S203C	n,a	68,84	80,92

n.d. Não determinado porque uma ampla transição em Tm2 impediu a determinação de Tm precisa,

n.a. Não aplicável

Exemplo 8. Ensaios de proliferação celular para medir a potência de morte celular *in vitro* de ADCs de Cys.

[00381] Células que naturalmente expressam antígenos alvo ou linhagens celulares construídas para expressar antígenos alvo são

frequentemente usadas para ensaiar a atividade e potência de ADCs. Para avaliação da potência de morte celular de ADCs de trastuzumabe *in vitro*, duas linhagens celulares construídas, clone 16 e clone 40 de MDA-MB231, e células HCC1954 foram empregados (Clinchy B, Gazdar A, Rabinovsky R, Yefenof E, Gordon B, Vitetta ES. Câncer de mama Res Treat. (2000) 61:217-228). Células de clone 16 de MDA-MB231 expressam estavelmente números de cópia elevados ($\sim 5 \times 10^5$ cópias/cavidade) de Her2 humana recombinante, enquanto que o clone 40 expressa números de cópia baixos ($\sim 5 \times 10^3$ cópias/célula) de Her2 humana. Células HCC1954 expressam endogenamente nível elevado ($\sim 5 \times 10^5$ cópias/célula) de Her2 humano na superfície. Para determinação da potência de morte celular de ADCs de anticorpo 14090, CMK11-5 e células Jurkat foram usadas. Enquanto que células CMK11-5 expressam um alto nível do antígeno para o anticorpo 14090 na superfície celular, não existe nenhuma expressão de antígeno detectável em células Jurkat. Um efeito citotóxico dependente do antígeno deve apenas matar células que expressam suficiente antígeno na superfície celular e não células que não possuem o antígeno. Os ensaios de proliferação celular foram conduzidos com Cell-Titer-Glo™ (Promega) cinco dias após as células serem incubadas com várias concentrações de ADCs (Riss *et al.*, (2004) Assay Drug Dev Technol. 2:51-62). Em alguns estudos, os ensaios com base em célula são de alta produtividade e conduzidos em um sistema automatizado (Melnick *et al.*, (2006) Proc Natl Acad Sci U S A. 103:3153-3158).

[00382] ADC de Cys-MMAF de trastuzumabes especificamente mataram o clone 16 de MDA-MB231 e HCC1954 porém não células de clone 40 de MDA-MB231 (FIG. 15). IC_{50} da ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe em ensaios celulares de clone 16 de MDA-MB231 varia de 30 pM a 200 pM (Tabela 20, FIG. 16). Similarmente, o ADC de Cys-

MMAF de anticorpo 14090 exibiu morte celular dependente de antígeno e ensaios de proliferação celular. os ADCs de Cys-MMAF de anticorpo 14090 mataram células CMK11-5 expresando antígeno, porém não células jurkat negativas de antígeno (FIG. 17). A IC₅₀ da ADC de anticorpo 14090-MMAF em ensaio de proliferação de CMK11-5 é na faixa de 400 pM a 1 nM (Tabela 21).

Tabela 20. IC₅₀ de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe em ensaio de proliferação de célula Her2⁺ de clone 16 de MDA-MB231.

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	IC ₅₀ (μM)	ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	IC ₅₀ (μM)
HC-S117C	1,55E-04	HC-R344C	2,75E-04
HC-S119C	1,18E-04	HC-R355C	1,21E-04
HC-K121C	1,06E-04	HC-K360C	1,92E-04
HC-S124C	9,78E-05	HC-S375C	1,42E-04
HC-T139C	1,48E-04	HC-E382C	2,53E-04
HC-E152C	7,62E-05	HC-N390C	1,58E-04
HC-P153C	9,27E-05	HC-K392C	1,43E-04
HC-T155C	1,33E-04	HC-L398C	1,08E-04
HC-S157C	1,47E-04	HC-S400C	1,43E-04
HC-T164C	1,34E-04	HC-V422C	1,72E-04
HC-T169C	1,98E-04	LC-K107C	2,59E-05
HC-P171C	1,33E-04	LC-R108C	2,96E-05
HC-L174C	1,19E-04	LC-T109C	8,12E-05
HC-P189C	1,82E-04	LC-S114C	3,37E-05
HC-K205C	1,02E-04	LC-T129C	2,73E-05
HC-S207C	2,16E-04	LC-R142C	2,64E-05
HC-K246C	9,54E-05	LC-E143C	3,76E-05
HC-E258C	9,40E-05	LC-K145C	3,87E-05
HC-E269C	8,98E-05	LC-N152C	2,14E-05
HC-K274C	9,99E-05	LC-L154C	3,52E-05
HC-N286C	9,94E-05	LC-S156C	4,28E-05
HC-K288C	7,47E-05	LC-S159C	4,34E-05
HC-K290C	3,55E-04	LC-E161C	3,62E-05
HC-R292C	9,69E-05	LC-E165C	4,68E-05
HC-E293C	1,10E-04	LC-S168C	2,50E-04
HC-K320C	9,79E-05	LC-K169C	7,74E-05
HC-K322C	1,16E-04	LC-D170C	1,64E-04
HC-K326C	1,73E-04	LC-S182C	9,07E-05
HC-E333C	1,28E-04	LC-K183C	8,39E-05

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	IC ₅₀ (μM)	ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	IC ₅₀ (μM)
HC-K334C	1,43E-04	LC-K188C	9,71E-05
HC-T335C	8,69E-05	LC-T197C	1,07E-04
HC-S337C	7,79E-05	LC-Q199C	1,31E-04
		LC-S203C	1,18E-04

Tabela 21. IC₅₀ de ADCs de Cys-MMAF de anticorpo 14090 em ensaio de proliferação de célula CMK11-5.

Anticorpo 14090 Cys-MMAF ADC	IC ₅₀ (μM)
HC-S124C	9,26E-04
HC-T139C	1,22E-03
HC-E152C	4,60E-04
HC-L174C	6,02E-04
HC-K360C	8,56E-04
HC-S375C	4,38E-04
LC-A143C	7,09E-04
LC-A147C	1,14E-03
LC-V159C	5,41E-04
LC-T163C	6,38E-04
LC-S168C	1,06E-03

Exemplo 9. Estudo de farmacocinético de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe.

[00383] Foi demonstrado que uma meia-vida de soro longa é crítica para alta eficácia *in vivo* de ADCs (Hamblett, *et al.*, “Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate,” *Clin Cancer Res.*, 10:7063-7070 (2004); Alley *et al.*, *Bioconjug Chem.* 19:759-765 (2008)). Ligação de uma carga útil de fármaco usualmente hidrofóbica a um anticorpo poderia afetar significativamente as propriedades de um anticorpo, e isto pode levar a uma rápida depuração das ADCs *in vivo* (Hamblett *et al.*, 2004) e pobre eficácia *in vivo*. Para avaliar os efeitos de diferente sítio de conjugação em depuração de ADCs de MMAF *in vivo*, estudos farmacocinéticos em camundongos não transportando tumor foram realizados com 65 ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe. Para

detectar MMAF contendo ADCs em plasma murino, um anticorpo anti-MMAF foi gerado. Ensaio ELISA para a detecção de ADCs foram desenvolvidos usando o domínio extracelular de HER2 humana para capturar moléculas IgG de trastuzumabe do plasma e um anticorpo IgG anti-humano (anti-hlgG) e o anticorpo anti-MMAF para geração de sinal em dois ensaios separados. Os dois ensaios ELISA avaliam a concentração de soro do anticorpo de trastuzumabe e o ADC “íntacta” respectivamente como discutido em maiores detalhes abaixo.

[00384] Três camundongos por grupo foram administrados com uma única dose de uma ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe a 1 mg/kg. Dez amostras de plasma foram coletadas durante o curso de duas semanas e avaliadas por ELISA usando o domínio extracelular de HER2 humana para capturar todas as moléculas de IgG de trastuzumabe incluindo ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe e trastuzumabe com ausência de MMAF. Um anticorpo anti hlgG e anti-MMAF foram em seguida usados para a detecção em dois ensaios separados. O anticorpo ELISA anti-MMAF mede a concentração de conjugados de MMAF de trastuzumabe apenas e o ELISA anti-hlgG quantifica ambos conjugados de Cys-MMAF de trastuzumabe e anticorpos de trastuzumabe com ausência de MMAF. Curvas padrões foram geradas para cada ADC separadamente usando o mesmo material injetado nos camundongos. Os ensaios com anti-MMAF e anti-hlgG devem portanto produzir idênticas leituras de concentração, se nenhuma mudança à carga de fármaco da ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe ocorrer após a injeção nos camundongos. Para ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe que perdem um pouco da carga útil de MMAF, o ensaio ELISA com o anticorpo anti-MMAF medirá uma menor concentração do que o ELISA anti-hlgG. Uma comparação das duas leituras de concentração, portanto, permite medir a liberação de fármaco de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe durante incubação

in vivo no camundongo.

[00385] Como medido por ELISA anti-hlgG, 63 de 65 ADCs apresentaram um perfil farmacocinético similar ao anticorpo de trastuzumabe tipo selvagem (FIGs. 18, 19, 20), indicando que a conjugação de carga útil de MC-MMAF a estes sítios não afetaram significativamente a depuração do anticorpo. As duas exceções são HC-T335C e HC-S337C. A conjugação de MC-MMAF a estes dois sítios resulta em rápida depuração das ADCs quando medida pelo ELISA anti-hlgG e o anti-MMAF (FIG. 21). O ensaio de mudança térmica da proteína revelou que a T_m1 para trastuzumabe HC-T335C-MMAF e trastuzumabe HC-S337C-MMAF diminuiu de 69°C em anticorpo de trastuzumabe tipo selvagem para 42°C e 45°C, respectivamente (FIG. 14). A conjugação de MC-MMAF aos dois sítios dramaticamente reduz a estabilidade térmica da ADC (em 27 °C e 24°C, respectivamente). Para as 63 ADCs que mostram um perfil farmacocinético similar ao anticorpo não conjugado, mudanças em T_m1 foram menores do que 8°C sugerindo que rápida depuração pode possivelmente correlaciona-se com baixa estabilidade térmica da ADC.

[00386] Para determinar a estabilidade química de ligação entre a carga útil de MMAF e o anticorpo em vários sítios de Cys, as concentrações de ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe quando medidas pelo ELISA anti-MMAF e de todas as moléculas de trastuzumabe quando medidas pelo ELISA anti-hlgG foram comparadas entre si para cada amostra. Muitas ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe, dentro do erro das medições, apresentaram uma boa sobreposição entre as duas concentrações durante o curso de duas semanas, sugerindo que a ligação entre MC-MMAF e a cisteína introduzida nestes sítios foi estável durante a circulação em camundongos durante este período (FIGs. 18, 19). Ao contrário, algumas ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe apresentaram uma

significante perda de fármaco como indicado pela maior leitura anti-hlgG do que a leitura anti-MMAF (FIG. 20). Para algumas ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe, a concentração de ADC foi de cerca de 50% daquela de hlgG. Estes resultados sugerem que existem significantes diferenças em estabilidade de uma ligação tiol-maleimida de cargas úteis de fármaco conjugadas a diferentes sítios como foi sugerido anteriormente (Shen et al. Nat. Biotechnol. 2012, 30 (2):184-9). Sítios tendo boa estabilidade são sítios preferidos para uso de preparação de ADCs como descrito aqui.

[00387] Em estudos farmacocinéticos, a área-sob-a-concentração de plasma versus curva de tempo (AUC) é um parâmetro importante na estimativa de depuração total e biodisponibilidade de um fármaco administrado. Em nossos estudos farmacocinéticos, para cada ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe dois valores AUC, AUC-MMAF e AUC-hlgG, foram calculados separadamente de medições com o anti-MMAF e o anti-hlgG ELISA. As relações de AUC-MMAF para AUC-hlgG para todas os ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe variaram de 0,4 a 1,2 (Tabela 20). As FIGs 18, 19 e 20 incluem curvas PK para ADCs sobre toda a faixa de relações observadas AUC-MMAF/AUC-hlgG e ilustram a variabilidade e incerteza das medições. As relações de AUC-MMAF para AUC-hlgG >1 (Tabela 20) sugerem incertezas de $>25\%$ visto que a relação deve permanecer próxima a 1 se nenhuma perda de fármaco ocorrer. Como mostrado na Tabela 20, das 63 ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe com AUCs mensuráveis de ambos os ELISAs, 40 ADCs mostram uma relação de AUC-MMAF/AUC-hlgG $>0,7$, indicando que dentro da precisão da medição, pequena perda de fármaco de MMAF foi observada nestas após a administração em camundongos. Entretanto, 23 ADCs apresentaram uma relação de AUC-MMAF/AUC-hlgG $<0,7$, sugerindo que a quantidade de conjugado de carga útil de MMAF nestes 23 sítios diminuiu

significativamente durante a incubação *in vivo* no camundongo.

[00388] Diferenças em estabilidade da ligação de maleimida em diferentes sítios de conjugação foram anteriormente reportadas para ADCs construídas de Cys (veja Shen *et al.*, (2012) Nat Biotechnol. 22;30(2):184-9 para discussão e referências). Para os sítios preferidos que exibem estabilidade de soro realçada, o ambiente do anticorpo igualmente catalisa a hidrólise do anel de succinimida formado pela reação de maleimida com cisteína. A forma hidrolisada não pode reverter novamente e não pode liberar o fármaco de maleimida. Como tal, a capacidade do ambiente de anticorpo catalisar a hidrólise de anel não pode ser predita e é uma propriedade inesperada de certos sítios de Cys construídos. Os sítios na Tabela 22 tendo uma relação AUC(MMAF)/AUC(hIgG) maior do que 0,7 são, portanto, sítios particularmente adequados para substituição de cisteína com base neste critério, e sítios tendo uma relação de cerca de 0,9 ou acima são sítios de substituição de cisteína especialmente preferidos, para os propósitos da invenção quando aplicando. Estes incluem sítios de cadeia pesada 322, 334, 121, 288, 171, 139, 360, 117, 392, 375, 292, 333, 174, 258, 337, 422, 320, 390, e 335; e sítios de cadeia leve 107, 203, 108 e 114.

Tabela 22. AUC-MMAF e AUC-hIgG de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe em camundongos

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	AUC-MMAF (hrs* μ g/ml)	AUC-hIgG (hrs* μ g/ml)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
HC-K246C-MMAF	1515	3587	0,4
HC-K205C-MMAF	2109	4893	0,4
LC-S168C-MMAF	1688	3619	0,5
LC-E143C-MMAF	1589	3254	0,5
HC-E382C-MMAF	1364	2541	0,5
HC-T155C-MMAF	2930	5308	0,6
HC-S119C-MMAF	2230	4045	0,6
LC-T129C-MMAF	2375	4332	0,6
LC-T109C-MMAF	1588	2716	0,6
LC-K169C-MMAF	2858	4855	0,6

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	AUC-MMAF (hrs*µg/ml)	AUC-hIlgG (hrs*µg/ml)	AUC(MMAF)/AUC(hIlgG)
HC-S400C-MMAF	2363	3922	0,6
HC-R355C-MMAF	2344	3777	0,6
HC-R344C-MMAF	1994	3215	0,6
LC-Q199C-MMAF	2042	3261	0,6
LC-S182C-MMAF	2434	3722	0,7
HC-P153C-MMAF	2201	3402	0,7
HC-N286C-MMAF	2286	3535	0,7
HC-T169C-MMAF	2113	3190	0,7
LC-K183C-MMAF	2014	3053	0,7
LC-T197C-MMAF	2126	3177	0,7
LC-K145C-MMAF	2339	3454	0,7
HC-L398C-MMAF	2063	2979	0,7
HC-P189C-MMAF	2042	2968	0,7
HC-S157C-MMAF	2625	3640	0,7
HC-E269C-MMAF	2373	3293	0,7
LC-S159C-MMAF	2063	2809	0,7
LC-E161C-MMAF	1974	2632	0,8
LC-E165C-MMAF	2481	3244	0,8
HC-T164C-MMAF	2514	3290	0,8
LC-R142C-MMAF	2903	3786	0,8
LC-S156C-MMAF	2217	2847	0,8
HC-S207C-MMAF	2378	3001	0,8
LC-N152C-MMAF	2303	2862	0,8
HC-E152C-MMAF	3403	4202	0,8
LC-L154C-MMAF	1959	2387	0,8
LC-K188C-MMAF	2230	2680	0,8
HC-K326C-MMAF	2621	3157	0,8
LC-D170C-MMAF	2048	2420	0,9
HC-K290C-MMAF	2668	3090	0,9
HC-E293C-MMAF	2167	2523	0,9
HC-S124C-MMAF	2107	2463	0,9
HC-K274C-MMAF	3080	3554	0,9
HC-K322C-MMAF	3108	3437	0,9
HC-K334C-MMAF	4527	5048	0,9
HC-K121C-MMAF	2647	2952	0,9
HC-K288C-MMAF	2681	2902	0,9
HC-P171C-MMAF	2312	2481	0,9
LC-K107C-MMAF	2621	2817	0,9
HC-T139C-MMAF	2951	3186	0,9
HC-K360C-MMAF	3791	4014	0,9
HC-S117C-MMAF	2661	2828	0,9

ADC de Cys-MMAF de trastuzumabe	AUC-MMAF (hrs* μ g/ml)	AUC-hIgG (hrs* μ g/ml)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
LC-S203C-MMAF	2730	2919	0,9
HC-K392C-MMAF	3148	3302	1,0
HC-S375C-MMAF	2593	2644	1,0
HC-R292C-MMAF	2816	2806	1,0
HC-E333C-MMAF	3850	3796	1,0
HC-L174C-MMAF	2604	2541	1,0
HC-E258C-MMAF	3941	3732	1,1
HC-S337C-MMAF	34,38	32,14	1,1
HC-V422C-MMAF	2662	2424	1,1
HC-K320C-MMAF	3181	2776	1,2
HC-N390C-MMAF	3627	3105	1,2
LC-R108C-MMAF	3711	2992	1,2
LC-S114C-MMAF	n.a.	2567	n.a.
HC-T335C-MMAF	6,71	n.a.	n.a.

n.a: não aplicável.

Exemplo 10: Combinação de sítios de Cys para produzir conjugados de fármaco de anticorpo com relações de fármaco-anticorpo maiores do que 2.

[00389] Conjugados de anticorpo produzidos através de conjugação para resíduos de lisina ou ligações de dissulfeto nativo parcialmente reduzidas muitas vezes apresentam relações fármaco-anticorpo (DAR) de entre 3 e 4. Anticorpos Cys construídos mais tipicamente apresentam um DAR de 2. Para certas indicações, pode ser desejável produzir ADCs com DAR mais elevado que pode em princípio ser ativado introduzindo mutações Cys múltiplas no anticorpo. Quando o número de mutação Cys aumenta, a probabilidade que tais mutações interfiram com o processo de reoxidação requerido durante preparação de ADC e conseqüentemente resulte em produtos heterogêneos também aumenta. Neste estudo, um grande número de mutantes Cys de cadeia leve e pesada de sítio simples com bom comportamento de reoxidação foi identificado.

[00390] Para demonstrar que diversos sítios de conjugação podem ser combinados para a produção de ADCs com DAR maior do que dois, diversas construções de Cys de sítio simples preferidas de cadeia leve e pesada de trastuzumabe e anticorpo 14090 (Tabela 23) foram

coexpressas em 293 células Freestyle™ como descrito no Exemplo 5. Anticorpos purificados os quais todos contêm uma mutação Cys na cadeia pesada e uma mutação Cys na cadeia leve foram reduzidos, reoxidados e conjugados com MC-MMAF como descrito no Exemplo 6. Cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa demonstrou um pico de eluição definido simples sugerindo eficiente reoxidação das ligações de dissulfeto nativas. Cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa após conjugação de MC-MMAF também mostrou predominantemente um pico de eluição simples para as espécies ADC de DAR 4. O DAR de todas ADCs na Tabela 23 foi confirmado ser 4 por espectrometria de massa. Os rendimentos de produção variaram de 16 a 24 mg/L de cultura celular transitória. Os ADCs foram predominantemente monoméricas como determinado por cromatografia por exclusão de tamanho analítica; somente para 2 dos 8 anticorpos podem pequenas quantidades de agregados ser detectadas (Tabela 23). ADCs de Trastuzumabe e 14090 exibiram morte celular dependente de antígeno em ensaios de proliferação celular de clone 16 MDA-MB231 e CMK1105, respectivamente (Tabela 23).

Tabela 23. Propriedades de ADCs de MMAF construídas de Cys com DAR de 4.

Cys-MMAF ADC (DAR=4)	LC SEQ ID NO	HC SEQ ID NO	Yield (mg/L)	AnSEC % de Monômero	AnSEC % de Multímero	IC ₅₀ MDA-MB231-16 células (µM)	IC ₅₀ CMK11-5 células (µM)
trastuzumabe LC-S159C-HC-E258C	75	29	17,3	100	Não detectado	4,91e-4	Nenhuma potência
trastuzumabe LC-S159C-HC-S375C	75	50	17,8	100	Não detectado	2,44e-4	Nenhuma potência
trastuzumabe LC-E165C-HC-E258C	77	29	16,5	100	Não detectado	3,24e-4	Nenhuma potência
trastuzumabe LC-E165C-HC-S375C	77	50	16,9	100	Não detectado	2,15e-4	Nenhuma potência
Anticorpo 14090 LC-A143C-HC-K360C	92	48	16,1	94,8	5,2	Nenhuma potência	4,92e-4

Anticorpo 14090 LC-A143C-HC- S375C	92	50	21,8	100	Não detectado	Nenhuma potência	4,76e-4
Anticorpo 14090 LC-V159C-HC- K360C	96	48	24,0	100	Não detectado	Nenhuma potência	4,55e-4
Anticorpo 14090 LC-V159C-HC- S375C	96	50	21,7	97,1	2,9	Nenhuma potência	3,99e-4

n.d.: não detectável,

nenhuma potência: nenhum sinal de morte celular na maior concentração avaliada (66 nM)

SEQ ID NOs apenas especificam regiões constantes de sequências de anticorpo.

Exemplo 11. Seleção de sítios de Cys com base em hidrofobicidade de ADC

[00391] Para também otimizar a seleção de mutantes Cys e combinações de mutante para a preparação de ADCs com DAR 2, 4, 6 e 8, as propriedades de ADCs de MMAF preparadas com mutantes Cys e Pcl de trastuzumabe de sítio simples (Preparação de ADCs de Pcl é descrita em pedido de patente 55573) foram analisadas, e exposição de solvente e acessibilidade de sítios de conjugação foi inspecionada nas estruturas de cristal de IgG.

[00392] Um dos dados mais informativos foi a observação que a hidrofobicidade de ADCs de Pcl-MMAF de trastuzumabe variou grandemente quando a carga útil foi ligada a diferentes sítios (Figura 23). A hidrofobicidade destas ADCs foi medida por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) usando uma coluna TSKgel Fenil-5PW (Tosoh Bioscience, TSKgel Fenil-5PW, 13 μ m, 21x150 mm, aço inoxidável, Cat# 07656; tampão de operação A: sulfato de amônio a 1,5 M em NaPi a 20 mM (pH 7,4); tampão B: 20 % de isopropanol em NaPi a 20 mM (pH 7,4); taxa de fluxo 5 ml/min; gradiente linear de 20 % a 80 % de tampão B durante 90 min; monitorado por absorvância de UV a 280 nm). Surpreendentemente, foi observado que tempos de

retenção das espécies de DAR 2 variaram grandemente entre ADCs apesar da diferença somente ser o sítio de ligação de ABA-MMAF (Figura 23). HIC separa moléculas sobre a base da hidrofobicidade. Todas os ADCs de DAR 2 têm um tempo de retenção de HIC maior do que aquele do anticorpo não conjugado (WT = 45 min, Figura 23) que é para ser esperado quando uma molécula de fármaco hidrofóbica tal como ABA-MMAF é ligada a um anticorpo. Entretanto, a ligação de uma carga útil em diferentes sítios aumenta a hidrofobicidade do ADC para várias extensões.

[00393] As diferenças surpreendentemente grandes em tempos de retenção podem ser racionalizadas da inspeção de locação dos sítios de ligação na estrutura de um anticorpo (Figura 24): Os tempos de retenção são maiores se a carga útil do fármaco for ligada em um sítio exposto do lado de fora de um anticorpo, por exemplo, em HC-K288Pcl, HC-N286Pcl, HC-V422Pcl, HC-L398Pcl e HC-S415Pcl onde tempo de retenção entre 87 e 94 min foi medido para as respectivas ADCs (Figura 23). Reciprocamente, se uma carga útil for ligada em um sítio interior tal como a cavidade formada entre variáveis e domínios CH1 (por exemplos, HC-P153Pcl, HC-E152Pcl, HC-L174Pcl, HC-P171Pcl, LC-R142Pcl, LC-E161Pcl, LC-E165Pcl, LC-S159Pcl) ou a grande abertura entre domínios CH2 e CH3 do anticorpo (por exemplo, HC-K246C, HC-S375Pcl, HC-T393Pcl, HC-K334Pcl), o tempo de retenção de HIC aumentava para somente 47 a 57 min porque a carga útil é parcialmente sequestrada de interagir com solvente e a coluna HIC. Para outros sítios, por exemplo, os sítios relativamente expostos, LC-K107Pcl e HC-K360Pcl, tempos de retenção intermediários de 70 e 83 min foram medidos.

[00394] Reduzir a hidrofobicidade de um fármaco de proteína é geralmente considerado benéfico porque pode reduzir agregação e liberação de circulação. Propomos que, os dados de HIC

apresentados na Figura 23 permita seleção de sítios de ligação de carga útil preferidos. Conjugação de cargas úteis de fármaco em sítios onde eles são sequestrados de ligação de interações de solvente minimamente aumenta a hidrofobicidade do anticorpo sobre a ligação de fármaco, e deve ser benéfico independente da química de conjugação e classe de carga útil. Cuidadosamente selecionar sítios de ligação que resultam em mudanças mínimas em hidrofobicidade pode ser particularmente benéfico quando 4, 6 ou 8 fármacos são ligados por anticorpo, ou quando cargas úteis particularmente hidrofóbicas são usadas.

Sítios Cys selecionados para ADCs com baixa hidrofobicidade:

[00395] Para minimizar a hidrofobicidade de ADCs, os sítios foram escolhidos que apontaria para o interior dos vários domínios de proteína do anticorpo. A seleção foi com base na análise da estrutura de anticorpo e comportamento das ADCs existentes com DAR=2 onde aplicável (comportamento = tempo de retenção sobre HIC e/ou tempo de retenção retardado sobre AnSEC com conjugados que interagem com resinas SEC). Dos sítios de Cys identificados na Tabela 1 e Tabela 2, os sítios listados na Tabela 24 cumprem os critérios acima.

[00396] Todas os ADCs foram analisadas por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Conjugados de ADCs de MMAF de Trastuzumabe nos sítios expostos HC-K360C, LC-K107C, HC-E258C e HC-R292C foram usados para propósitos de comparação. Os resultados são mostrados na Tabela 25. O ADC de Cys-MMAF de trastuzumabes e anticorpo do tipo selvagem não conjugado foram analisados em uma coluna TSKgel Butyl-NPR como descrito abaixo. Para comparação, os dados de HIC anteriormente obtidos para ADCs de Pcl-MMAF em uma TSKgel Fenil-5PW (Figura 23) são também listados. Apesar de diferentes instrumentação e protocolos, e apesar de alguma variabilidade ser esperada devido a diferente geometria e

estruturas dos dois ligantes, a relação de tempos de retenção para o conjugado de ADC na mesma posição, porém, através de diferentes métodos de conjugação permanece quase constante. Os dados de HIC sugerem que tempos de retenção sejam de fato uma medida de quão bem a carga útil é sequestrada no interior do anticorpo independente de química de ligação e estrutura de ligante. Como esperado, a classificação relativa dos diferentes sítios de ligação permanece em grande parte idêntica para ADCs de Pcl-MMAF e Cys-MMAF.

[00397] Ligação ao sítio selecionado na Tabela 24, HC-E333C, HC-K392C, e HC-K326C resulta em ADCs de MMAF que têm tempos de retenção de HIC que são similares às ADCs de sítio exposto LC-K107C-MMAF, HC-E258C-MMAF, HC-R292C-MMAF e HC-K360C-MMAF (Tabela 28). Ligação aos sítios HC-E152C, LC-E165C, HC-P171C, LC-R142C, LC-E161C, HC-L174C e HC-S124C aumenta o tempo de retenção do ADC resultante por menos do que 15 % comparado ao anticorpo de tipo selvagem não conjugado. Estes sítios são todos localizados no domínio de CH1 ou na cadeia leve (LC) e dados de tempo de retenção de HIC os sugerem como sítios de ligação preferidos. Dois sítios de domínio CH3, HC-K334C e HC-S375C exibem o menor aumento em hidrofobicidade em conjugação, tornando-os sítios de união preferidos.

Tabela 24. Sítios mutantes de Cys

Sítio mutante de Cys	Sítio (EU No.)
LC-R142C	142
LC-S159C	159
LC-E161C	161
LC-E165C	165
HC-S124C	124
HC-E152C	152
HC-P171C	171

HC-L174C	174
HC-K326C	326
HC-E333C	333
HC-K334C	334
HC-S375C	375
HC-K392C	392

Tabela 25. Tempo de retenção de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) das espécies DAR 2 de ADCs de MMAF de trastuzumabe.

[00398] Comparando química de conjugação Cys e Pcl, os dois conjuntos concordam bem: sítios que ocultam o conjugado de fármaco por uma química também tendem a ocultar o fármaco quando conjugado pela outra química. Alguma variabilidade é esperada devido a diferente geometria dos dois sistemas de ligante.

Trastuzumabe ADC	Retenção ^a de HIC de DAR2 HIC (min)	ADC de Trastuzumabe	Retenção ^b de HIC de DAR2 (min)	Relação
WT	19,5	WT	45	0,43
HC-E152C-MMAF	20,4	HC-E152Pcl-MMAF	50	0,41
LC-E165C-MMAF	20,8	LC-E165Pcl-MMAF	55	0,38
HC-P171C-MMAF	21,0	HC-P171Pcl-MMAF	51	0,41
HC-K334C-MMAF	21,5	HC-K334Pcl-MMAF	56	0,38
HC-S375C-MMAF	21,6	HC-S375Pcl-MMAF	52	0,42
LC-R142C-MMAF	21,7	LC-R142Pcl-MMAF	51	0,42
LC-E161C-MMAF	22,0	LC-E161Pcl-MMAF	55	0,40
HC-L174C-MMAF	22,0	HC-L174Pcl-MMAF	50	0,44
HC-S124C-MMAF	22,4	HC-S124Pcl-MMAF	59	0,38
HC-E333C-MMAF	23,1	HC-E333Pcl-MMAF	63	0,37
HC-K392C-MMAF	23,1	HC-K392Pcl-MMAF	60	0,38
HC-R292C-MMAF	23,8	HC-R292Pcl-MMAF	69	0,35
HC-K326C-MMAF	24,5	HC-K326Pcl-MMAF	72	0,34
LC-K107C-MMAF	24,8	LC-K107Pcl-MMAF	70	0,35
HC-E258C-MMAF	24,9	HC-E258Pcl-MMAF	69	0,36
HC-K360C-MMAF	26,8	HC-K360Pcl-MMAF	83	0,32

^a HIC analítico: coluna Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA)

TSKgel Butil-NPR (100 mm × 4,6 mm, 2,5 µm), tampão de operação A: fosfato de sódio a 50 mM, sulfato de amônio a 1,5 M, pH 7,0; tampão B: fosfato de sódio a 50 mM, pH 7,0; gradiente consistiu em 5 min retendo 100 % de A, seguido por um gradiente linear de 20 a 100 % de B durante 40 min; monitorado por absorção de UV a 280 nm.

^b HIC Semi-prep: Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA), TSKgel Fenil-5PW, 13 µm, 21x150 mm; tampão de operação A: sulfato de amônio a 1,5 M em NaPi a 20 mM (pH 7,4); tampão B: 20 % de isopropanol em NaPi a 20 mM (pH 7,4); taxa de fluxo 5 ml/min; gradiente linear de 20 % a 80 % de tampão B durante 90 min; monitorado por absorção de UV a 280 nm.

Protocolo de HIC analítico em detalhes:

[00399] Os dados de HIC analítico para ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe foram coletados usando uma coluna Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA) TSKgel Butil-NPR (100 mm × 4,6 mm, 2,5 µm) instalada em uma Dionex UltiMate 3000 HPLC (Sunnyvale, CA, USA). O método consistiu em um gradiente binário de tampão A (fosfato de sódio a 50 mM, sulfato de amônio a 1,5 M, pH 7,0) e tampão B (fosfato de sódio a 50 mM, pH 7,0). Amostras foram preparadas diluindo aproximadamente 50 µg de anticorpo (PBS) com um volume igual de sulfato de amônio a 3 M. O gradiente consistiu em 5 min de retenção a 100 % de A, seguido por um gradiente linear de 20 a 100 % de B durante 40 min e finalmente reequilibrando em condições iniciais durante 10 min antes da próxima injeção. A separação foi monitorada por absorção de UV a 280 nm.

Preparação e caracterização de ADCs de Cys de DAR 4, 6 e 8

[00400] Mutações Cys podem ser combinadas para a preparação de ADCs de DAR 4, 6 e 8. Em geral, a combinação preferida é uma combinação de duas mutações Cys resultando em ADCs com DAR 4. Alguns exemplos que envolvem combinar um mutante Cys de cadeia

pesada (HC) com um mutante Cys de cadeia leve (LC) para a preparação de ADCs de DAR 4 são mostrados no Exemplo 10 para trastuzumabe e para anticorpo 14090. Dados adicionais são fornecidos na Tabela 26. Com base nos dados de HIC e a inspeção de sítios de ligação nas estruturas cristais de IgG, combinações Cys adicionais foram preparadas usando os protocolos descritos nos Exemplos 2, 5 e 6. Os dados para exemplos selecionados de ADCs de MMAF são mostrados na Tabela 26. Além disso, sítios de cadeia pesada selecionados foram combinados e mutações Cys da cadeia pesada duplas foram clonadas seguindo protocolos listados no Exemplo 2. Anticorpos caracterizando duas mutações Cys de HC foram preparados e conjugados seguindo protocolos descritos nos Exemplos 5 e 6.

[00401] Para a preparação de ADCs de DAR 4, combinações incluem mutações de sítio simples listadas na Tabela 24. Combinações de sítios simples resultaram em ADCs com baixa hidrofobicidade (Tabela 25). Em algumas combinações, uma mutação Cys é localizada no domínio CH1 ou na cadeia leve e o segundo sítio é localizado no domínio CH3. Exemplos de tais combinações são anticorpos caracterizando combinações de mutante Cys de HC-E152C e HC-S375C, e LC-E165C e HC-S375C, e HC-E152C e HC-K334C, e LC-E165C e HC-K334C.

[00402] ADCs com DAR 6 e 8 podem também ser preparadas quando três ou quatro mutações Cys são combinadas em um anticorpo. Combinações de cadeia pesada selecionadas foram combinadas para as preparações de ADCs de DAR 4, 6 e 8. Mutações Cys duplas e triplas da cadeia pesada foram clonadas seguindo os protocolos listados no Exemplo 2. Anticorpos caracterizando duas, três e quatro mutações Cys foram preparados e conjugados seguindo os protocolos descritos nos Exemplos 5 e 6. As características de alguns

exemplos de ADC de DAR 4, DAR 6 e DAR 8 são sumarizadas na Tabela 26. Algumas destas ADCs têm propriedades de PK surpreendentemente boas como mostrado na Figura 25. Anticorpo 14090 é de reação cruzada de camundongo e, portanto, ADCs de anticorpo 14090, como esperado, são liberadas mais rapidamente do que ADCs de trastuzumabe que não se ligam a quaisquer antígenos de camundongo.

[00403] Combinações incluem aquelas com três e quatro das mutações de sítio simples listadas na Tabela 24. Combinações incluem aqueles sítios que resultaram em ADCs com baixa hidrofobicidade (Tabela 25). Combinações incluem uma mutação Cys que é localizada no domínio CH1 ou na cadeia leve (LC), e opcionalmente mais um a três sítios são no domínio CH3. Exemplos de tais combinações incluem anticorpos caracterizando combinações de mutante Cys de HC-E152C ou LC-E165C, com HC-S375C, com HC-K334C, e/ou HC-K392C. Combinações preferidas para a preparação de ADCs de DAR 6 e DAR 8 são mostradas na Tabela 27 e Tabela 28 respectivamente.

[00404] Com algumas exceções, ligação de MMAF em todos os sítios de Cys estudados resulta em ADCs com estabilidade térmica elevada (Exemplo 7, Tabela 19), baixa propensão para agregar (Exemplo 6, Tabela 18) e boas propriedades farmacocinéticas de ADCs de DAR 2 (Exemplo 9, Tabela 22, Figura 18). Diferenças em hidrofobicidade de ADC aparentemente não se traduzem em grandes diferenças em propriedades farmacocinéticas e biofísicas quando uma carga útil relativamente solúvel tal como MMAF for usada. De fato, como é mostrado acima, ADCs de MMAF de DAR 4, DAR 6 e DAR 8 com propriedades farmacocinéticas aceitáveis podem ser preparadas meso usando sítios “hidrofóbicos” expostos tal como HC-K360C em combinação com sítios de ligação mais preferidos. Entretanto, quando

menos bem comportado, mais cargas úteis hidrofóbicas são usadas, cuidadosamente selecionar sítios de ligação que resultam em mudanças mínimas em hidrofobicidade, pode ser essencial para permitir a preparação de ADCs não agregantes com boas propriedades farmacocinéticas. Para tais cargas úteis hidrofóbicas, usando combinação de sítios que reduz a hidrofobicidade aumentos podem ser benéficos quando 4, 6 ou 8 fármacos são ligados por anticorpo.

Tabela 26. Caracterização de ADCs de MMAF de DAR 4, 6 e 8 selecionados preparada com combinações de Mutações Cys.

Nome de ADC de Cys-MMAF	DAR	% Multímero AnSEC	AUC MMAF/ AUC hIgG
trastuzumabe-HC-E258C-LC-S159C-MMAF	4,0	n.d.	0,9
trastuzumabe-HC-S375C-LC-S159C-MMAF	4,0	n.d.	0,8
trastuzumabe-HC-E258C-LC-E165C-MMAF	4,0	n.d.	0,9
trastuzumabe-HC-S375C-LC-E165C-MMAF	4,0	n.d.	0,8
trastuzumabe-HC-E152C-LC-R142C-MMAF	3,8	n.d.	0,9
trastuzumabe-HC-P171C-LC-R142C-MMAF	3,8	0,1	1,1
trastuzumabe-HC-E152C-LC-S159C-MMAF	3,8	n/a	0,7
Anticorpo 14090-HC-S375C-LC-A143C-MMAF	4,0	n.d.	0,9
Anticorpo 14090-HC-K360C-LC-V159C-MMAF	4,0	n.d.	1,0
Anticorpo 14090-HC-S375C-LC-V159C-MMAF	4,0	2,9	1,0
trastuzumabe-HC-K334C-S375C-LC-E165C-MMAF	6,0	n.d.	0,8
trastuzumabe-HC-K334C-K392C-LC-E165C-MMAF	5,8	11	0,4
trastuzumabe-HC-K334C-K360C-S375C-LC-E165C-MMAF	8,0	5	0,6
trastuzumabe-HC-K334C-K360C-K392C-LC-E165C-MMAF	7,8	n.d.	0,8
trastuzumabe-HC-K334C-S375C-K392C-LC-E165C-MMAF	8,0	n.d.	0,7

*Cálculos de AUC com base em medições de Pk de camundongo com ensaios ELISA anti-MMAF e anti-IgG.

n.d.; não detectado, abaixo do limite de quantificação.

Tabela 27. Combinações preferidas de sítios de Cys para a preparação de ADCs de DAR 6.

Combinação de ADC	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3
1	HC-E152C	HC-S375C	HC-K392C
2	HC-E152C	HC-S375C	HC-K334C
3	HC-E152C	HC-K334C	HC-K392C
4	LC-E165C	HC-S375C	HC-K392C
5	LC-E165C	HC-S375C	HC-K334C
6	LC-E165C	HC-K334C	HC-K392C

Tabela 28. Combinações preferidas de sítios de Cys para a preparação de ADCs de DAR 8.

CoMbinção de ADC	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4
1	HC-E152C	HC-S375C	HC-K334C	HC-K392C
2	HC-E152C	HC-S375C	HC-E333C	HC-K392C
3	LC-E165C	HC-S375C	HC-K334C	HC-K392C
4	LC-E165C	HC-S375C	HC-E333C	HC-K392C

Exemplo 12. Estudos de eficácia *in vivo* de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe.

[00405] Modelos de tumor de xenoenxerto *in vivo* simulam atividade biológica observada enxertando relevantes e bem caracterizados tumores primários humanos ou linhagens de célula de tumor em camundongos nus imunodeficientes. Estudos sobre tratamento de camundongos com xenoenxerto de tumor com reagentes anticâncer forneceram informações valiosas sobre eficácia *in vivo* dos reagentes testados (Sausville e Burger, 2006). Visto que células de clone 16 MDA-MB231 foram sensíveis às ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe de maneira dependente de antígeno (Figura 15), a linhagem celular foi escolhida como o modelo *in vivo* para avaliar os ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe. Todos os estudos de animal foram conduzidos de acordo com the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals (NIH publication; National Academy Press, 8^a Ed., 2001). Células de clone 16 MDA-MB231 foram implantadas em camundongos nu/nu subcutaneamente (Morton e Houghton, 2007). Após o tamanho do tumor atingir ~200 mm³, ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe foram administradas nos camundongos por injeção IV em uma dose única a 3 mg/kg. O desenvolvimento do tumor foi medido semanalmente após injeção de ADC. Cada grupo de tratamento incluiu 9 camundongos. Um exemplo do estudo de eficácia *in vivo* é indicado na Figura 22 com três ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe. Tratamento de camundongos com 3 mg/kg de ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe causou regressão do tumor para todas as três ADCs de Cys-MMAF testadas (Figura 22). Nenhuma perda de peso foi observada associada com o tratamento de ADC. Os resultados confirmaram que com um tratamento de dose única a 3 mg/kg, ADCs de Cys-MMAF de trastuzumabe efetivamente causaram regressão de tumores de clone 16 MDA-MB231.

REIVINDICAÇÕES

1. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo compreendendo domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada e uma substituição por cisteína na posição de aminoácido 152 da região constante de cadeia pesada, em que o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado está conectado com uma porção de fármaco para formar o imunoconjugado via a substituição por cisteína na posição de aminoácido 152,

e em que a referida posição é numerada de acordo com o sistema EU.

2. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado compreende a sequência da SEQ ID NO: 10.

3. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo compreendendo domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada, e uma combinação de substituições por cisteína nas posições de aminoácidos 152 e 375 da região constante de cadeia pesada, em que o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado está conectado com uma porção de fármaco para formar o imunoconjugado via a combinação de substituições de cisteína nas posições de aminoácidos 152 e 375, e

em que as referidas posições são numeradas de acordo com o sistema EU.

4. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo compreendendo domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada e uma combinação de substituições por cisteína, em que o anticorpo modificado ou

fragmento de anticorpo modificado está conectado com uma porção de fármaco para formar o imunocombinado via a combinação de substituições por cisteína, em que as posições da combinação de substituições por cisteína compreendem:

a. posições de aminoácido 152, 375 e 392 da região constante de cadeia pesada;

b. posições de aminoácido 152, 334 e 375 da região constante de cadeia pesada; ou

c. posições de aminoácido 152, 334 e 392 da região constante de cadeia pesada,

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

5. Imunocombinado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo compreendendo domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada e uma combinação de substituições por cisteína, em que o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado está conectado com uma porção de fármaco para formar o imunocombinado via a combinação de substituições por cisteína, em que as posições da combinação de substituições por cisteína compreendem:

a. posições de aminoácidos 152, 334, 375, e 392 da região constante de cadeia pesada; ou

b. posições de aminoácidos 152, 333, 375, e 392 da região constante de cadeia pesada;

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

6. Imunocombinados, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizados pelo fato de que a razão de fármaco-anticorpo é 2, 4, 6 ou 8.

7. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a porção de fármaco é ligada ao anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado por meio do enxofre da referida cisteína e um ligante opcional.

8. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a referida porção de fármaco é conectada ao referido enxofre da referida cisteína por meio de um ligante clivável ou não clivável.

9. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que compreende uma ligação tiol-maleimida, uma ligação $-S-CH_2-C(=O)-$ ou uma ligação de dissulfeto.

10. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a referida porção de fármaco é um agente citotóxico.

11. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido agente citotóxico é selecionado dentre o grupo consistindo em taxanos, agentes de alquilação de DNA (por exemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatinas e maitansinoides.

12. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo modificado é um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo totalmente humanizado, um anticorpo biespecífico ou um anticorpo multiespecífico.

13. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado se liga

especificamente a um marcador de superfície celular característico de um tumor.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o imunoconjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e um veículo farmacologicamente aceitável.

15. Anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada e uma substituição por cisteína na posição de aminoácido 152 da região constante de cadeia pesada do referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, e em que a referida posição é numerada de acordo com o sistema EU.

16. Anticorpo IgG modificado ou fragmento de anticorpo modificado do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende domínios CH1, CH2 e CH3 da região constante de cadeia pesada e uma combinação de substituições por cisteína na região constante de cadeia pesada, em que a combinação de substituições por cisteína é selecionada dentre:

a. posições de aminoácidos 152 e 375 da região constante de cadeia pesada;

b. posições de aminoácidos 152, 375 e 392 da região constante de cadeia pesada;

c. posições de aminoácidos 152, 334 e 375 da região constante de cadeia pesada;

d. posições de aminoácidos 152, 334 e 392 da região constante de cadeia pesada;

e. posições 152, 334, 375, e 392 da região constante de cadeia pesada; ou

f. posições de aminoácidos 152, 333, 375, e 392 da região constante de cadeia pesada;

e em que as referidas posições de amoniácidos são numeradas de acordo com o sistema EU.

17. Anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma cadeia leve.

18. Anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve é uma cadeia kappa.

19. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que expressa o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 18, em que a célula hospedeira é um microrganismo transgênico.

20. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de levedura, uma célula de *Pichia*, uma célula de fungo ou uma célula de *Trichoderma*.

21. Método para produção de um anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, caracterizado pelo fato de que compreende a incubação da célula hospedeira, como definida na reivindicação 19 ou 20, sob condições adequadas para expressar o anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado, e o isolamento do referido anticorpo modificado ou fragmento de anticorpo modificado.

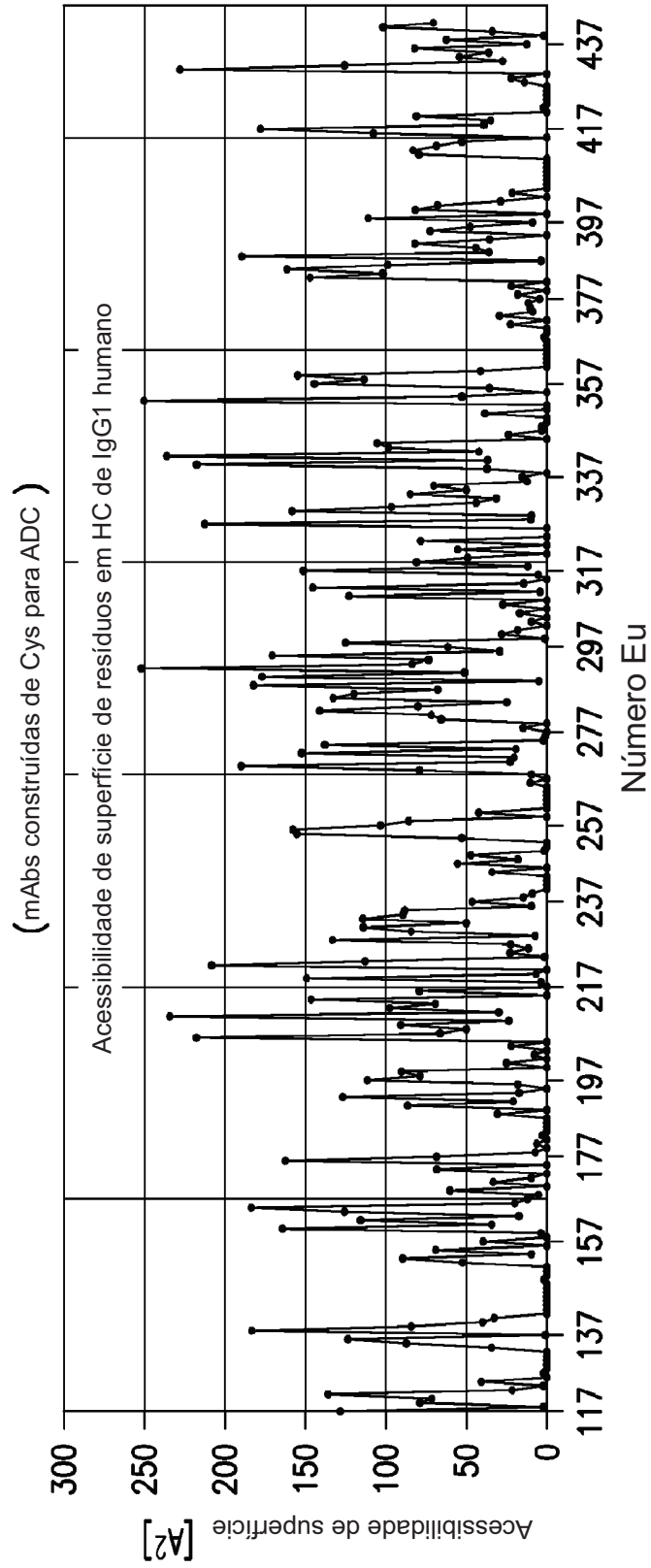


FIG.1A

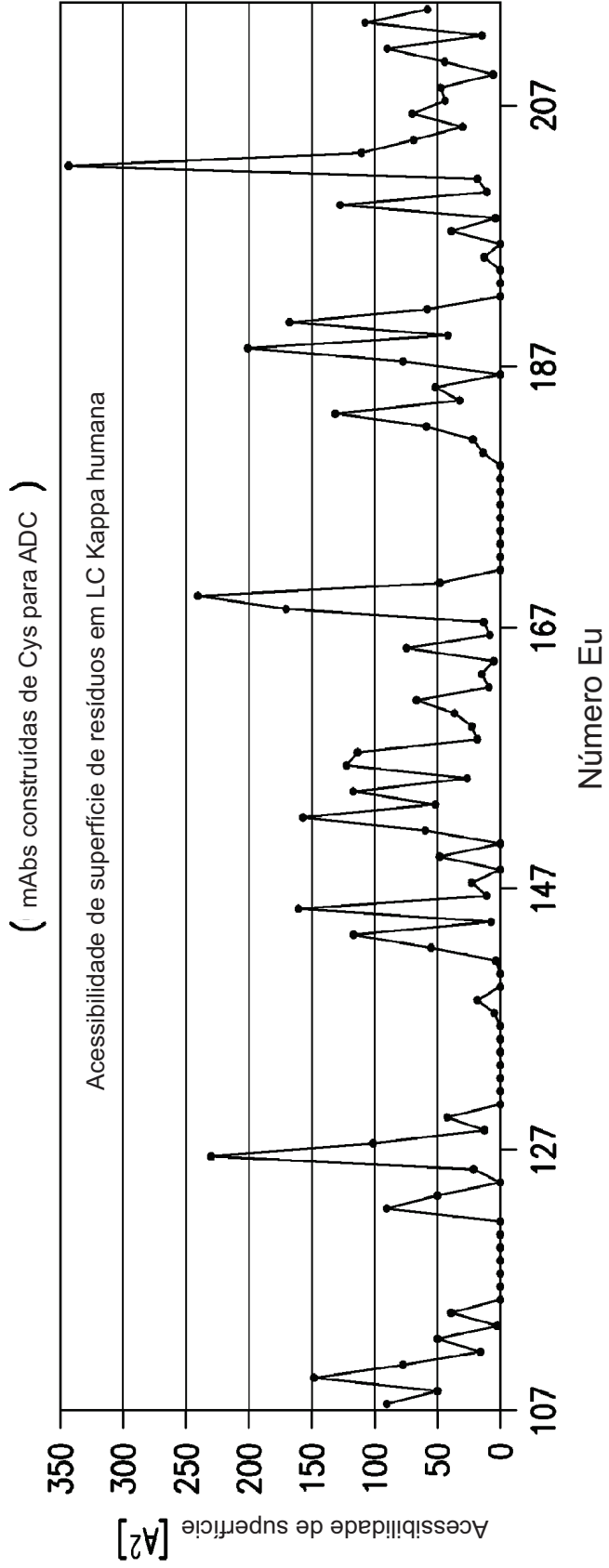


FIG.1B

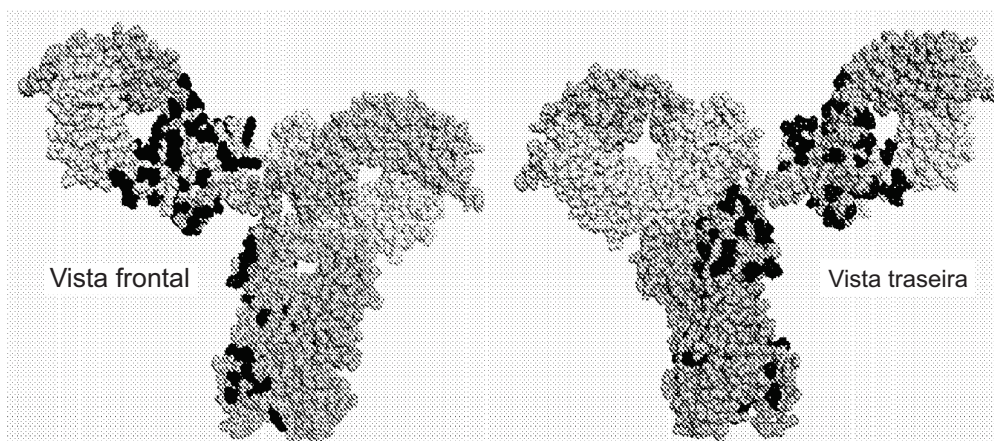


FIG.2

Tras SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS 176
 14090 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS 176
 Tras SGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLG 236
 14090 SGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLG 236
 Tras GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY 296
 14090 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY 296
 Tras NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE 356
 14090 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE 356
 Tras EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR 416
 14090 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR 416
 Tras WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
 14090 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447

FIG.3

119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
119	STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQT	197
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	230
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	230
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	227
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	227
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	227
198	YICNWNHKPSNTKVDKVE	227
231	APELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREEQNSTYRWWSVLTVLH	310
231	APELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREEQNSTYRWWSVLTVLH	310
228	APPVAG-PSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREEQNSTYRWWSVLTVLH	306
278	APELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREEQNSTYRWWSVLTVLH	357
228	APELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREEQNSTYRWWSVLTVLH	307
311	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENN	390
311	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENN	390
307	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENN	386
358	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENN	437
308	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENN	387
391	YKTIPTPVLDSGGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	446
391	YKTIPTPVLDSGGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	446
387	YKTIPTPMLDSGGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	442
438	YKTIPTPMLDSGGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	493
388	YKTIPTPVLDSGGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	443
Trastuzumabe, Região C de cadeia gama-1 de Ig		
P01857[1-330],	Região C de cadeia gama-1 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01859[f-326],	Região C de cadeia gama-2 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01860[1-377],	Região C de cadeia gama-3 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01861[1-327],	Região C de cadeia gama-4 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
Trastuzumabe, Região C de cadeia gama-1 de Ig		
P01857[1-330],	Região C de cadeia gama-1 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01859[f-326],	Região C de cadeia gama-2 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01860[1-377],	Região C de cadeia gama-3 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01861[1-327],	Região C de cadeia gama-4 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
Trastuzumabe, Região C de cadeia gama-1 de Ig		
P01857[1-330],	Região C de cadeia gama-1 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01859[f-326],	Região C de cadeia gama-2 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01860[1-377],	Região C de cadeia gama-3 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01861[1-327],	Região C de cadeia gama-4 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
Trastuzumabe, Região C de cadeia gama-1 de Ig		
P01857[1-330],	Região C de cadeia gama-1 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01859[f-326],	Região C de cadeia gama-2 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01860[1-377],	Região C de cadeia gama-3 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>
P01861[1-327],	Região C de cadeia gama-4 de Ig,	<i>Homo sapiens</i>

FIG. 4

Kappa RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA-LQSGNSQESVTEQDSK
 AAPSV +FPPS E+L++ A++VCL+++FYP V WK D++ +++G E+ T
 Lambda QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG--VETTTPSKQS
 Kappa DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 ++ Y+ SS L+L+ ++ H+ Y+C+VTH+G S V K+ EC
 Lambda NNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTECS

FIG.5A

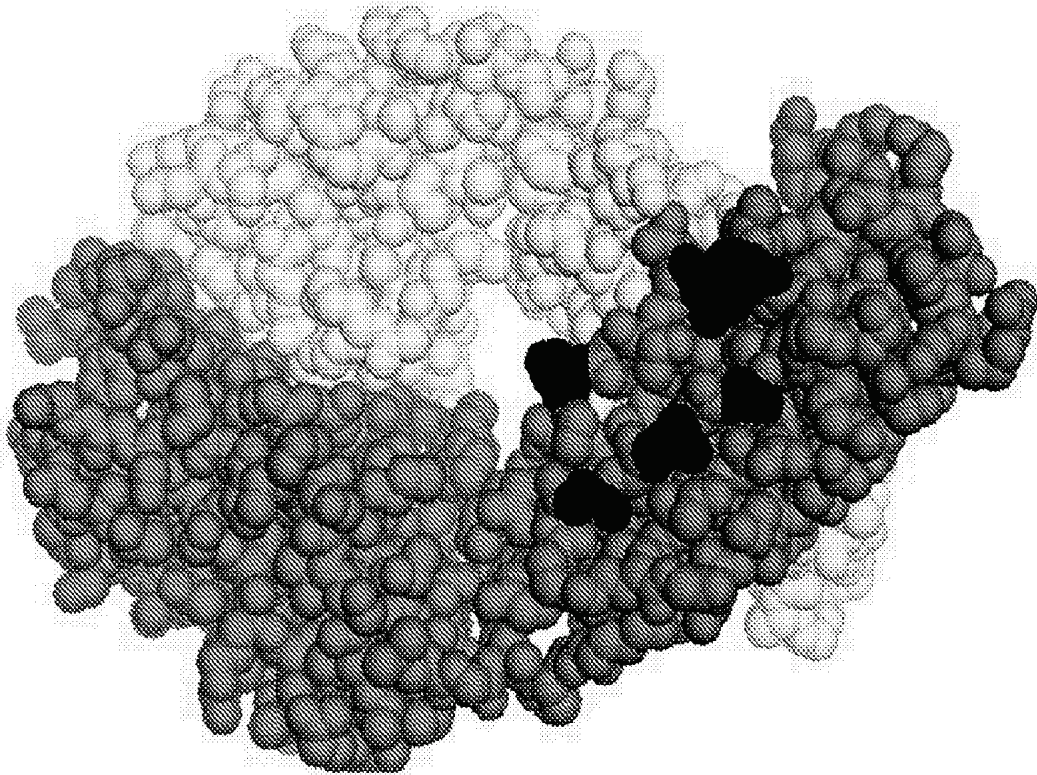


FIG.5B

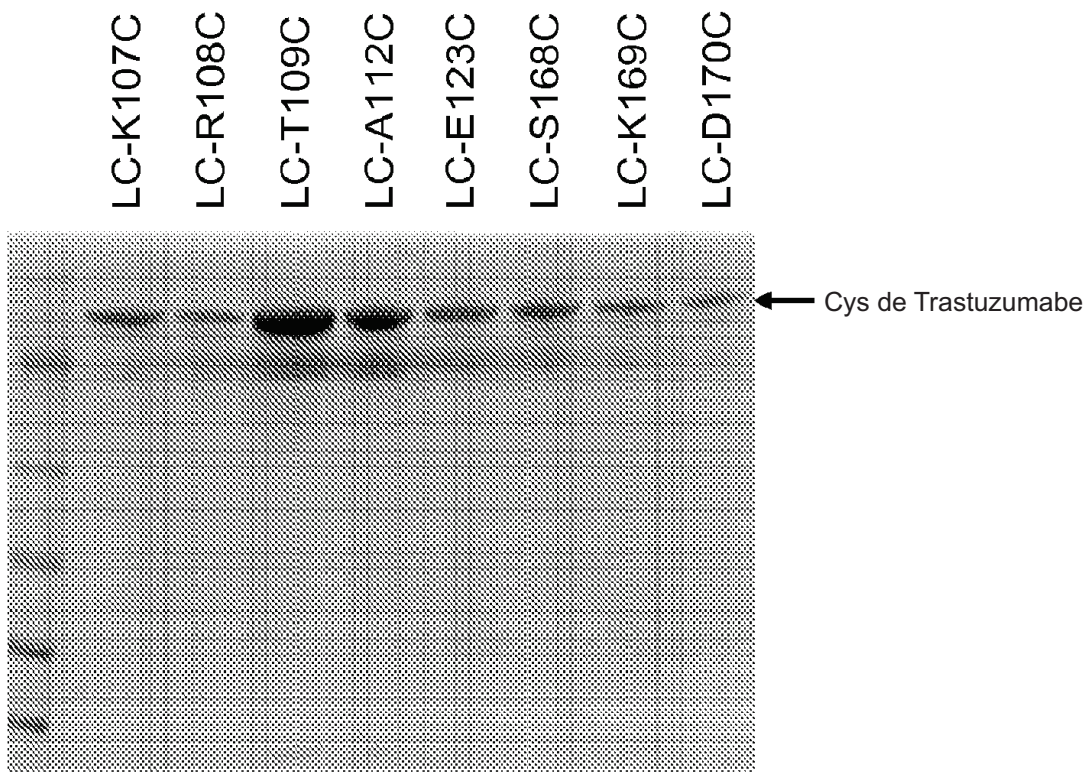


FIG.6

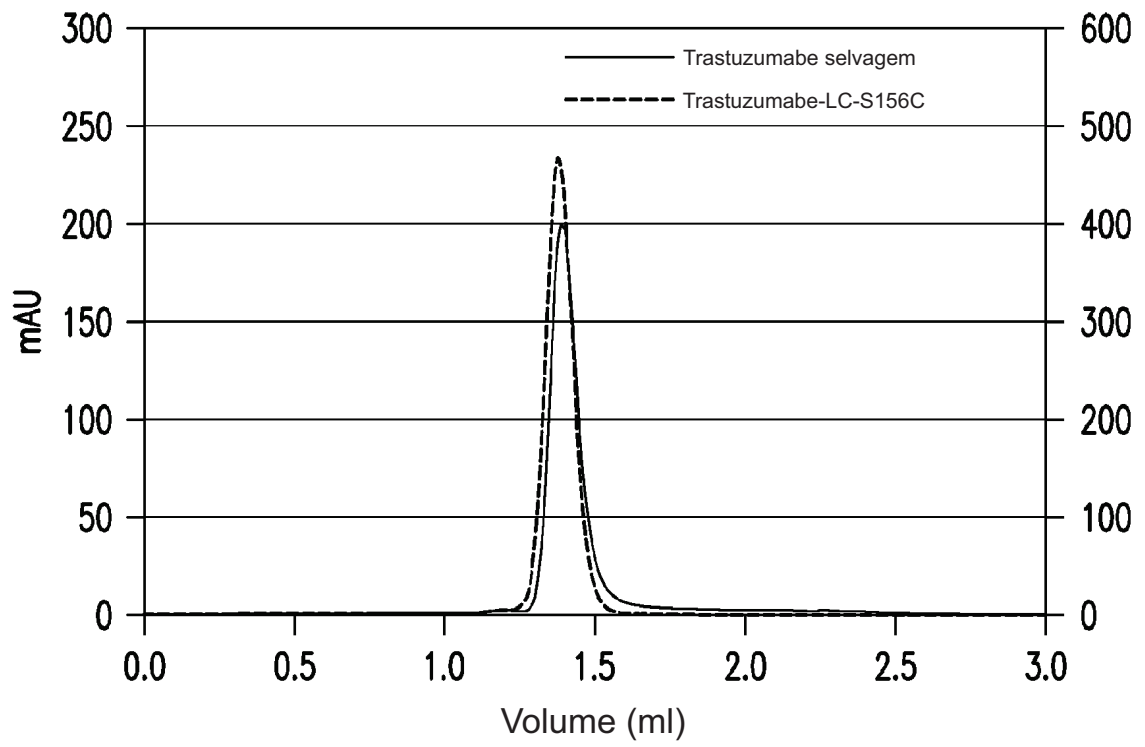


FIG.7

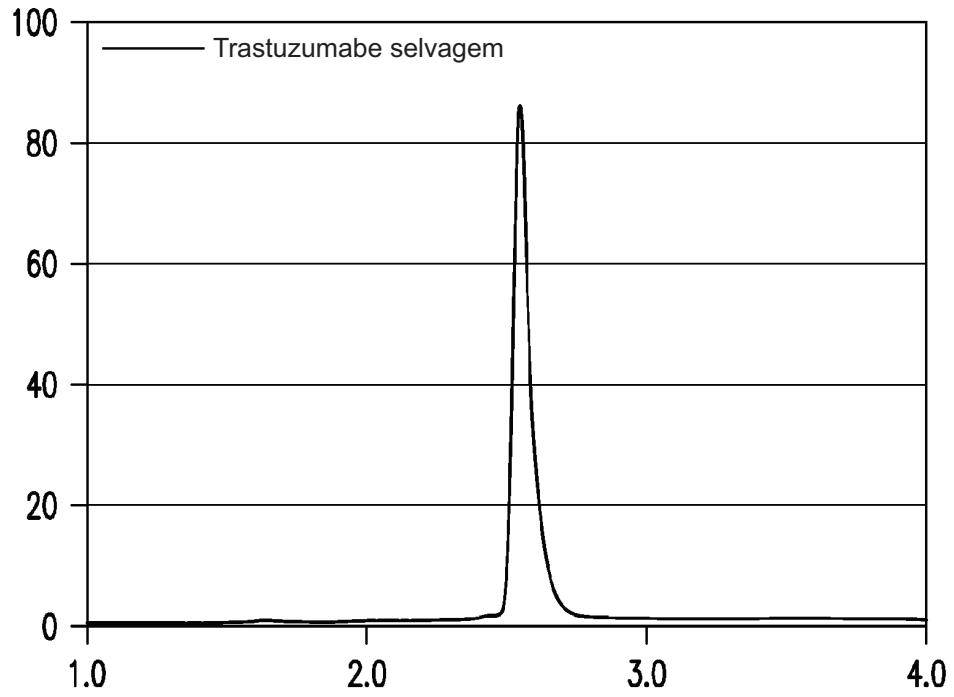


FIG.8A

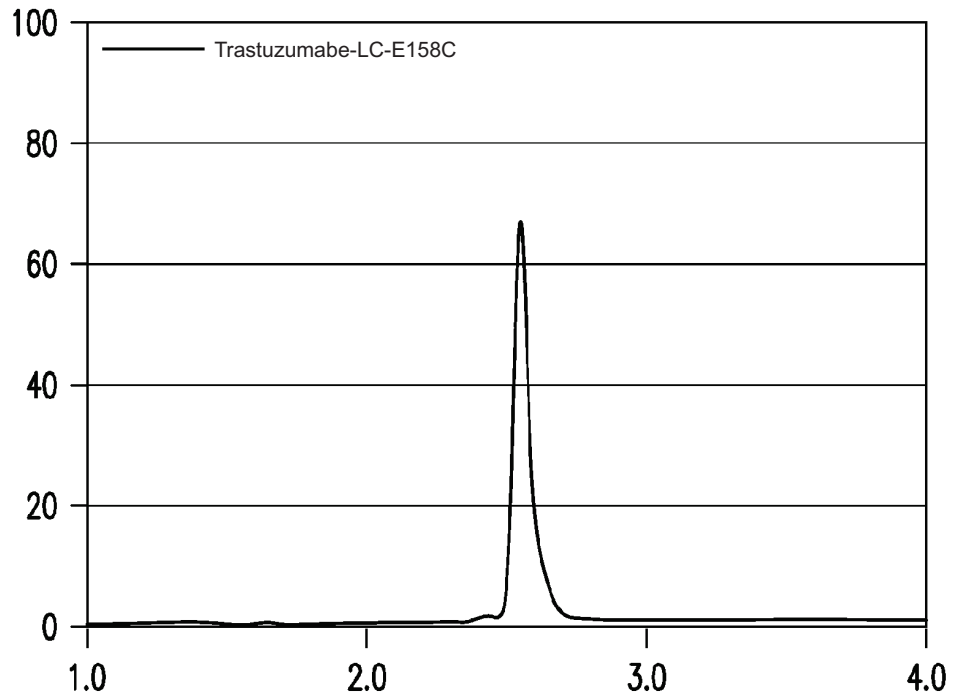
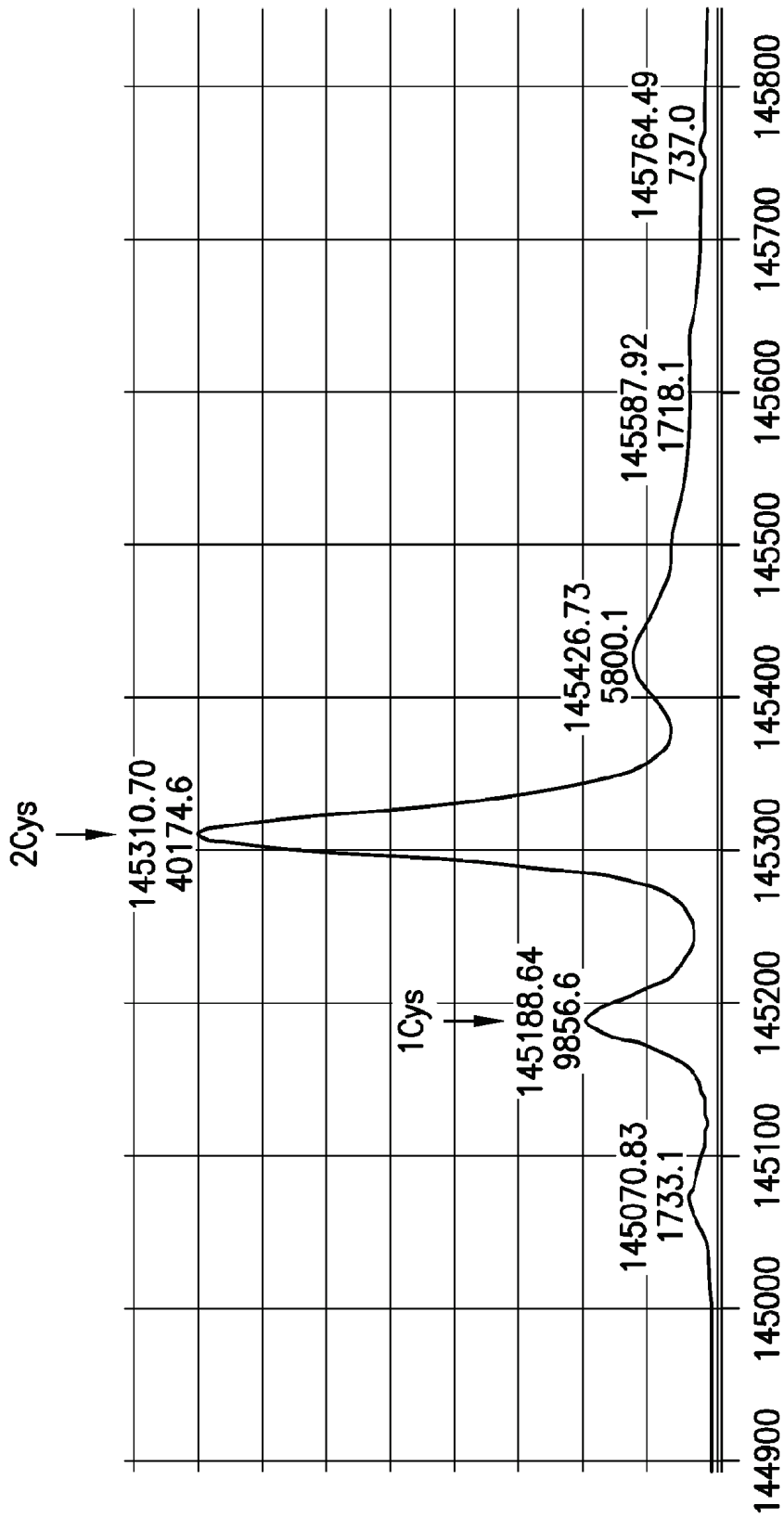


FIG.8B



Contagens versus massa desconvoluta (amu)

FIG.9

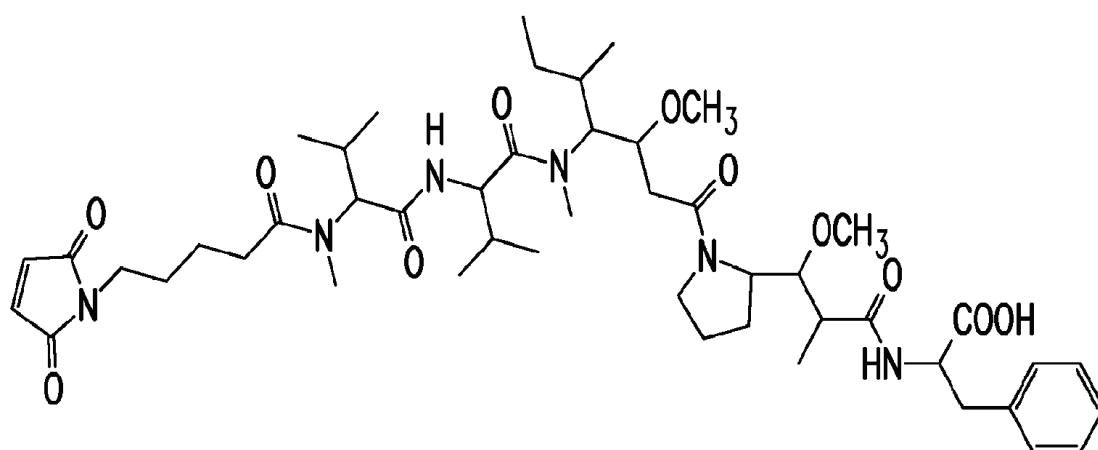


FIG. 10

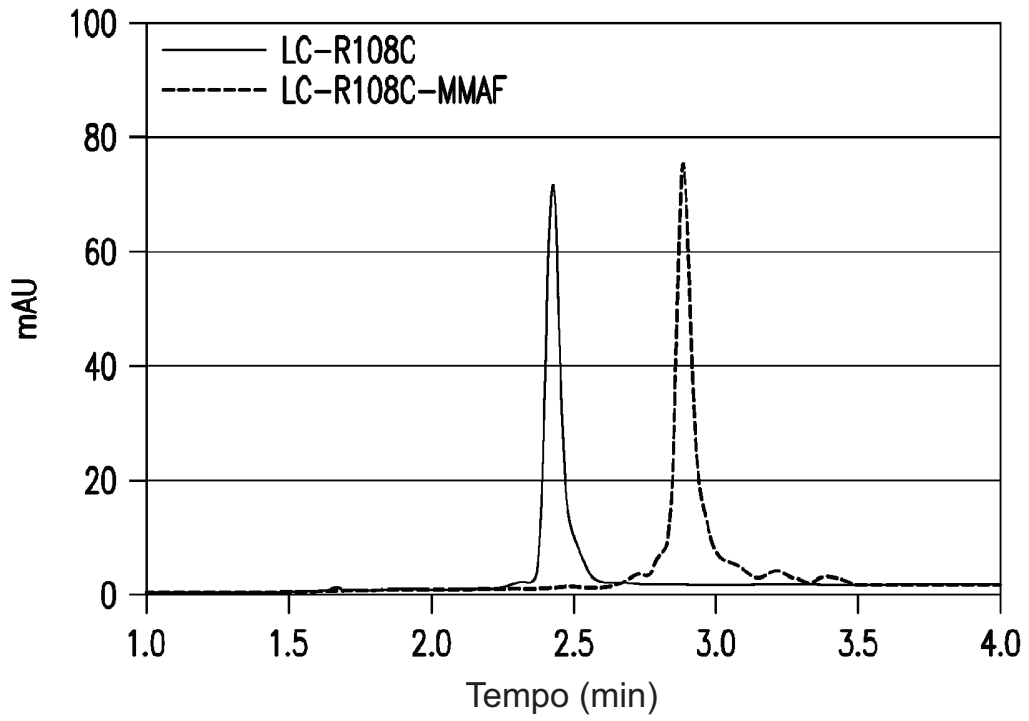


FIG. 11A

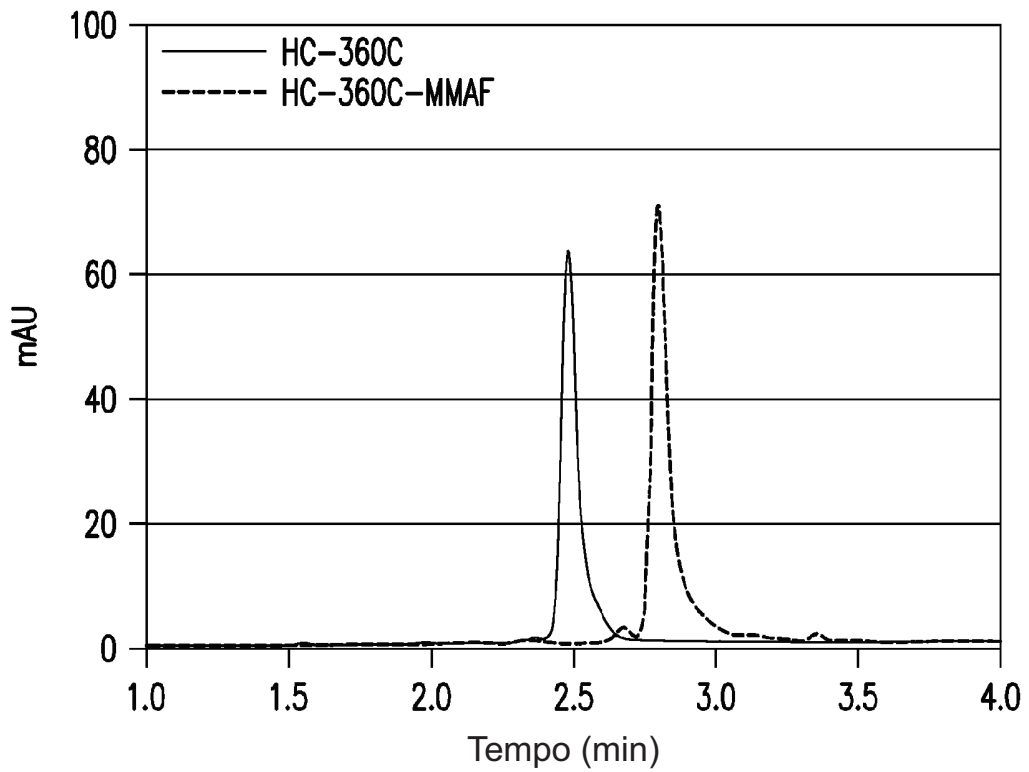


FIG. 11B

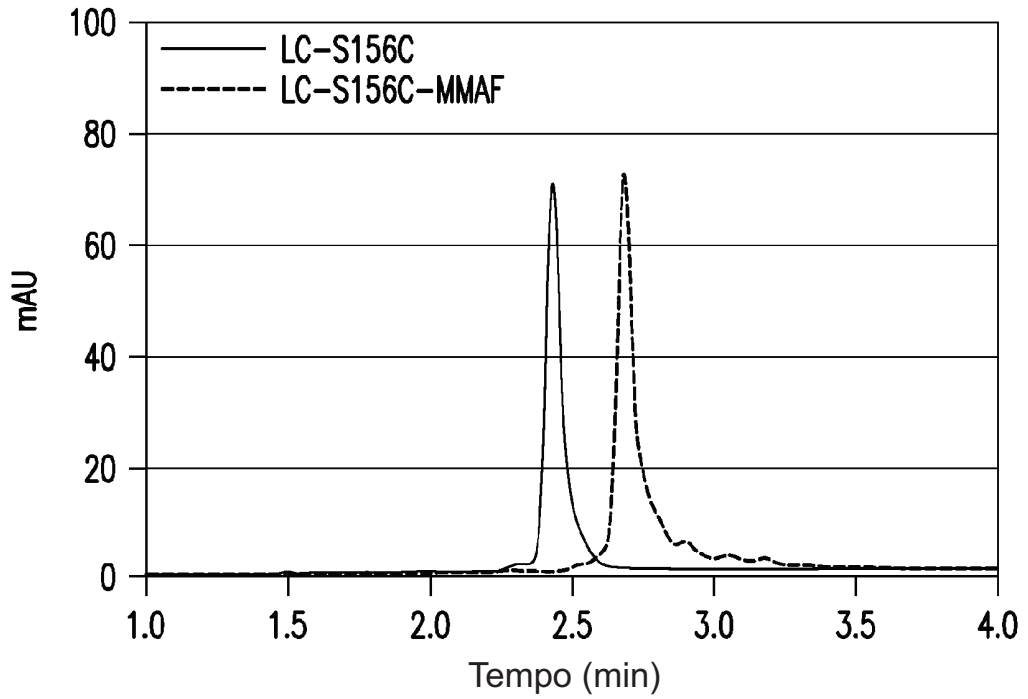


FIG. 11C

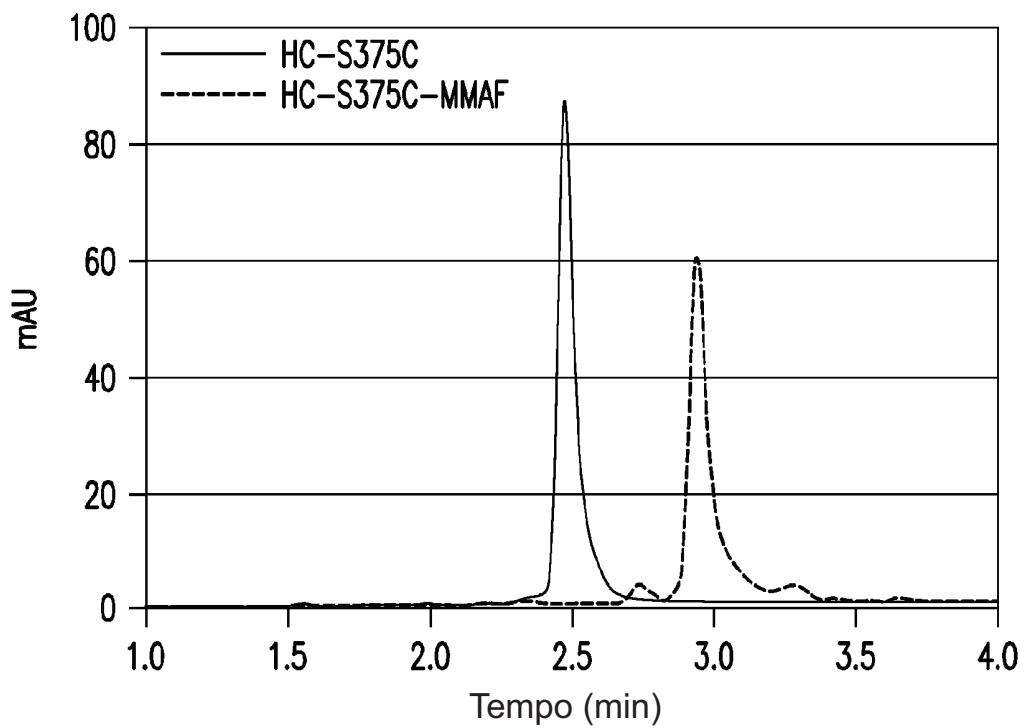


FIG. 11D

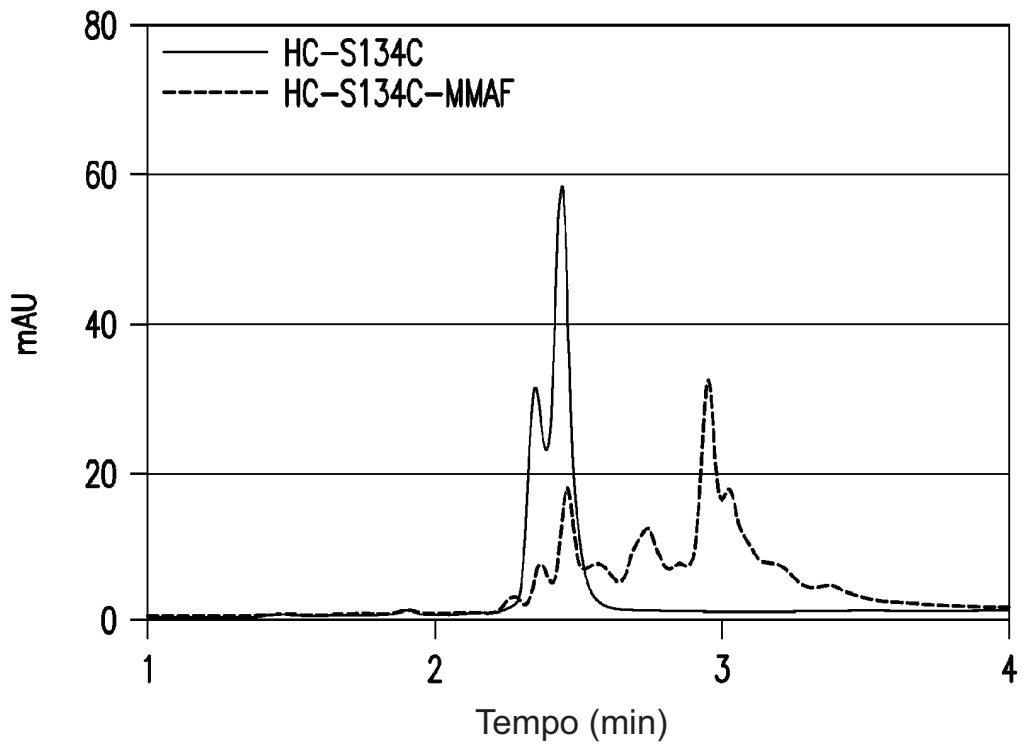


FIG. 12A

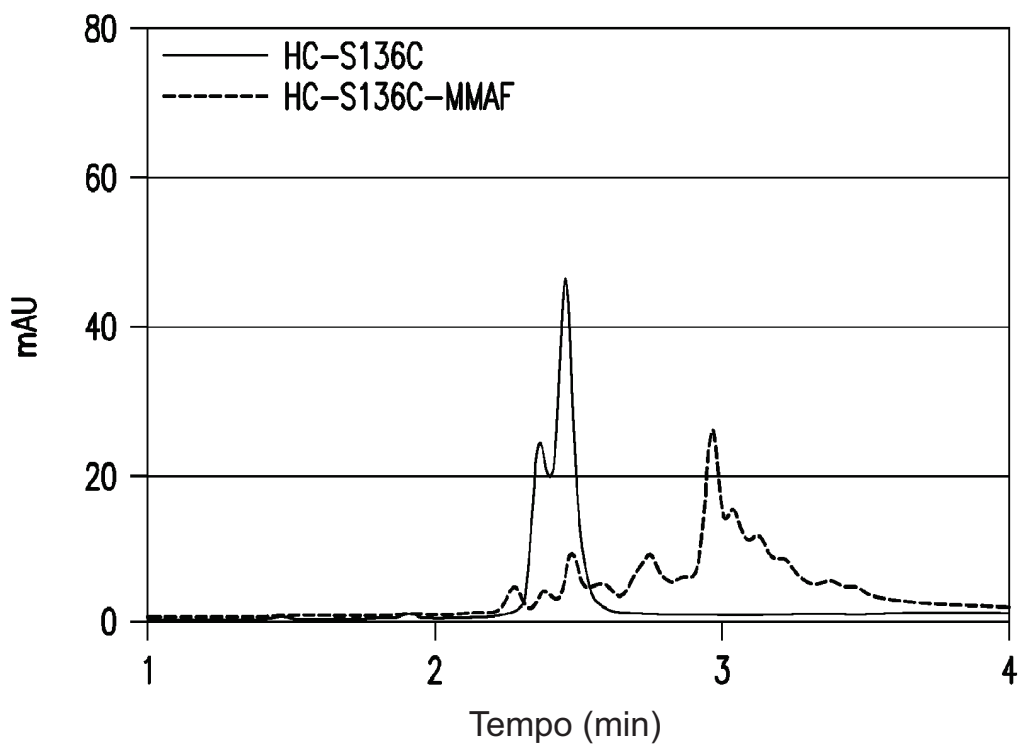


FIG. 12B

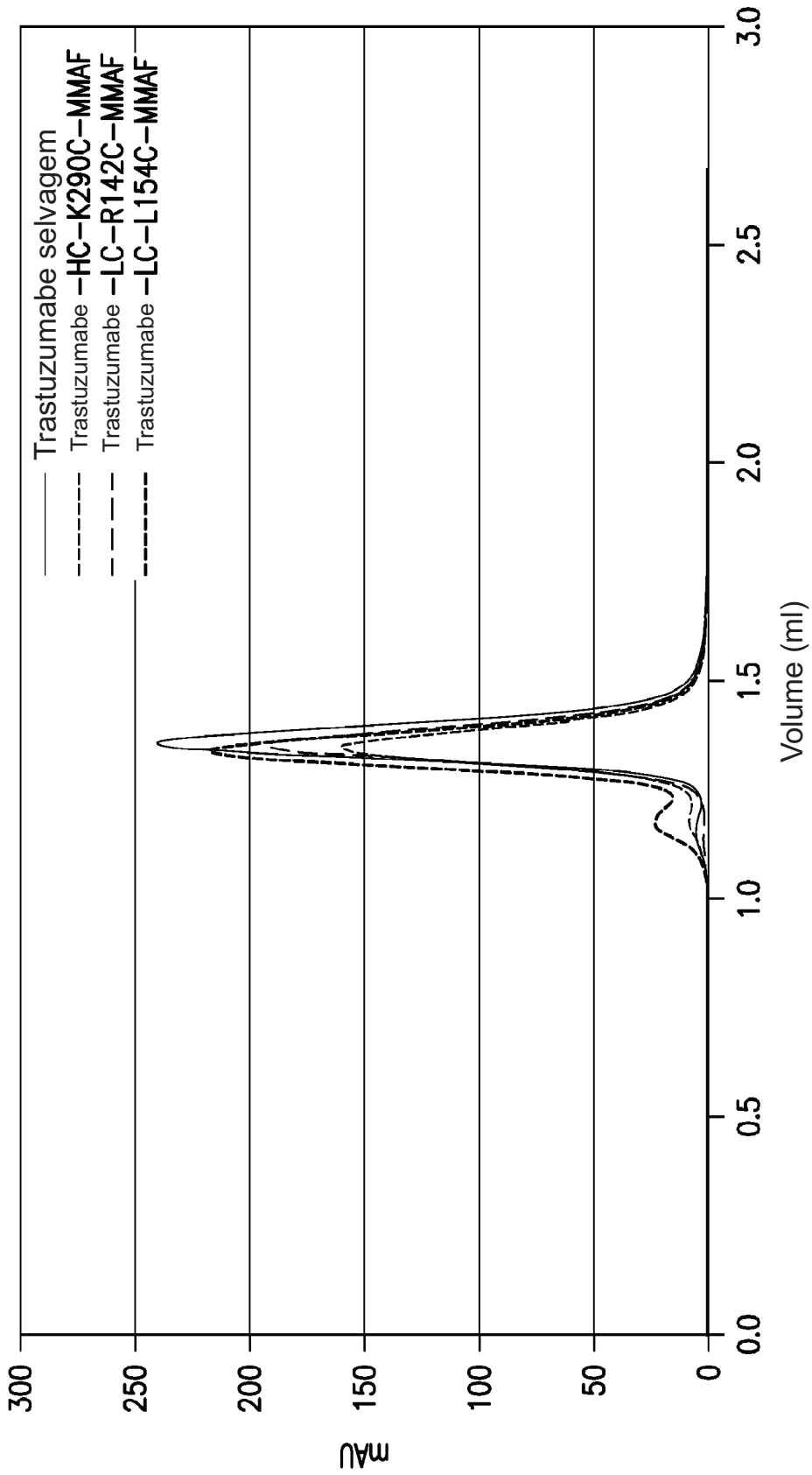


FIG. 13

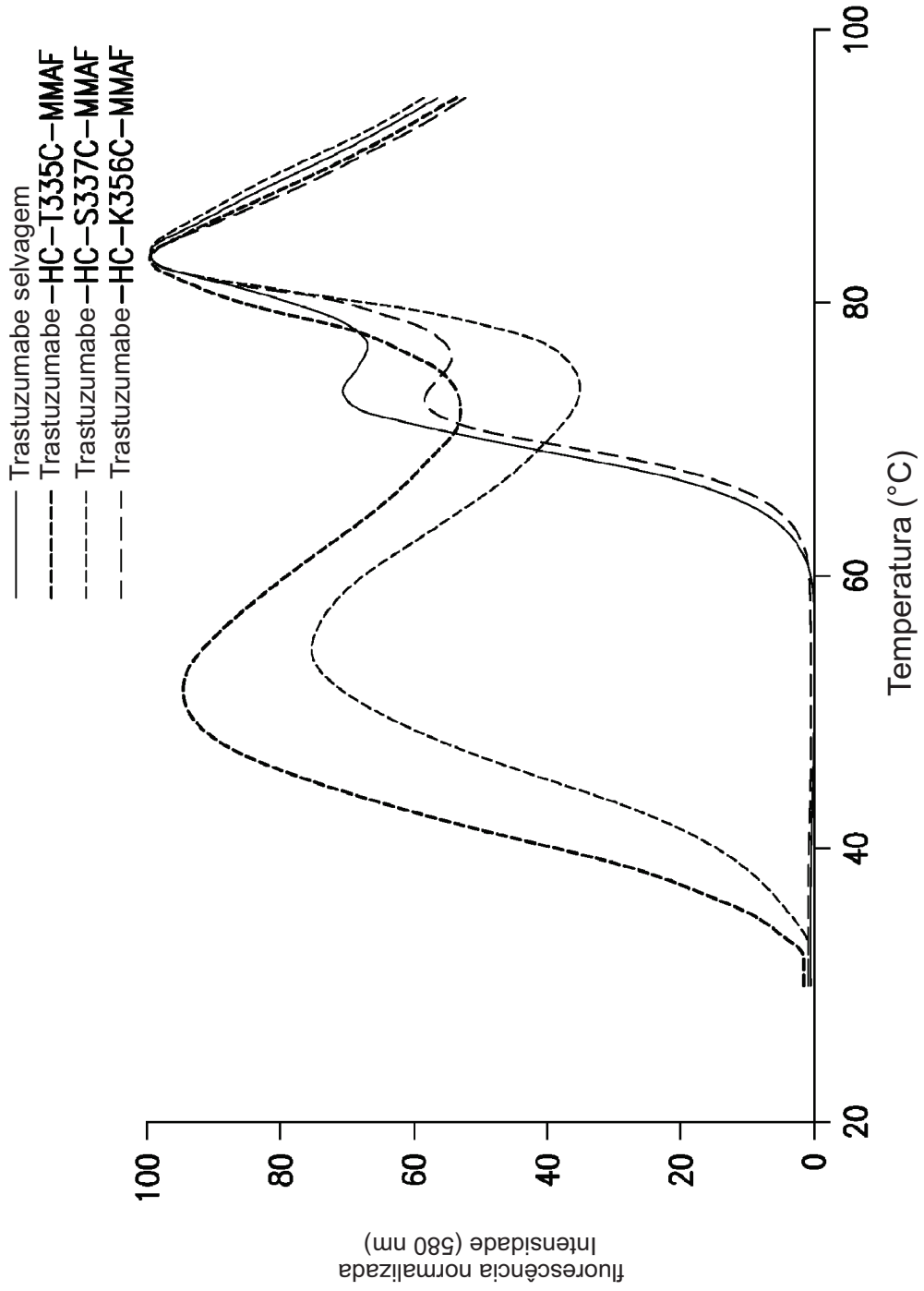


FIG.14

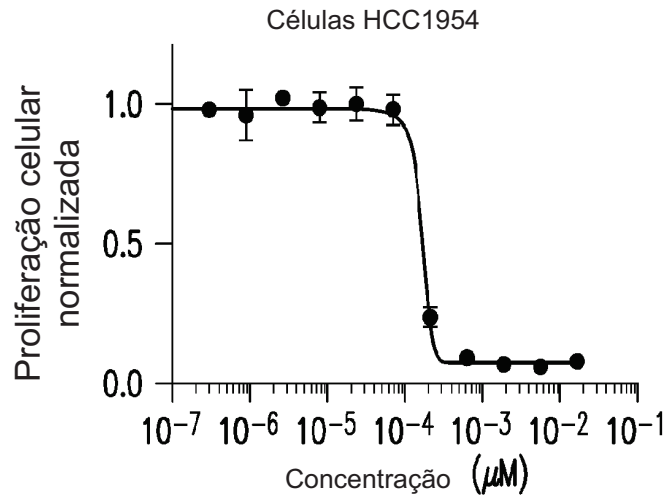


FIG. 15A

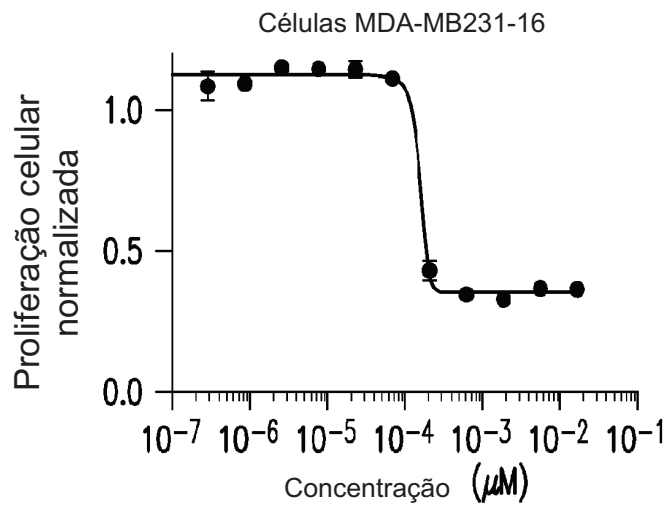


FIG. 15B

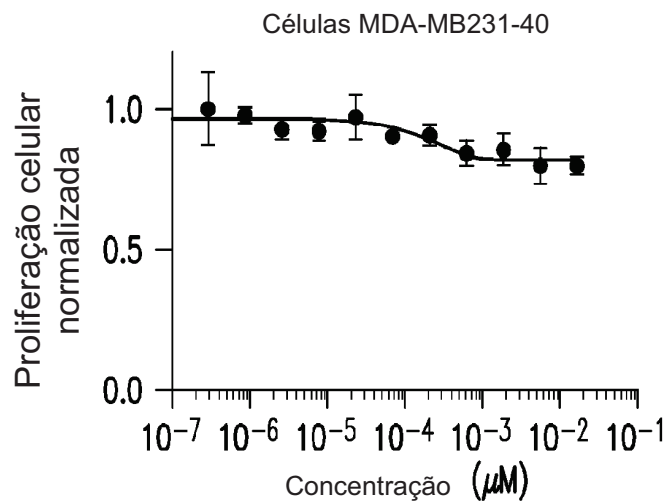


FIG. 15C

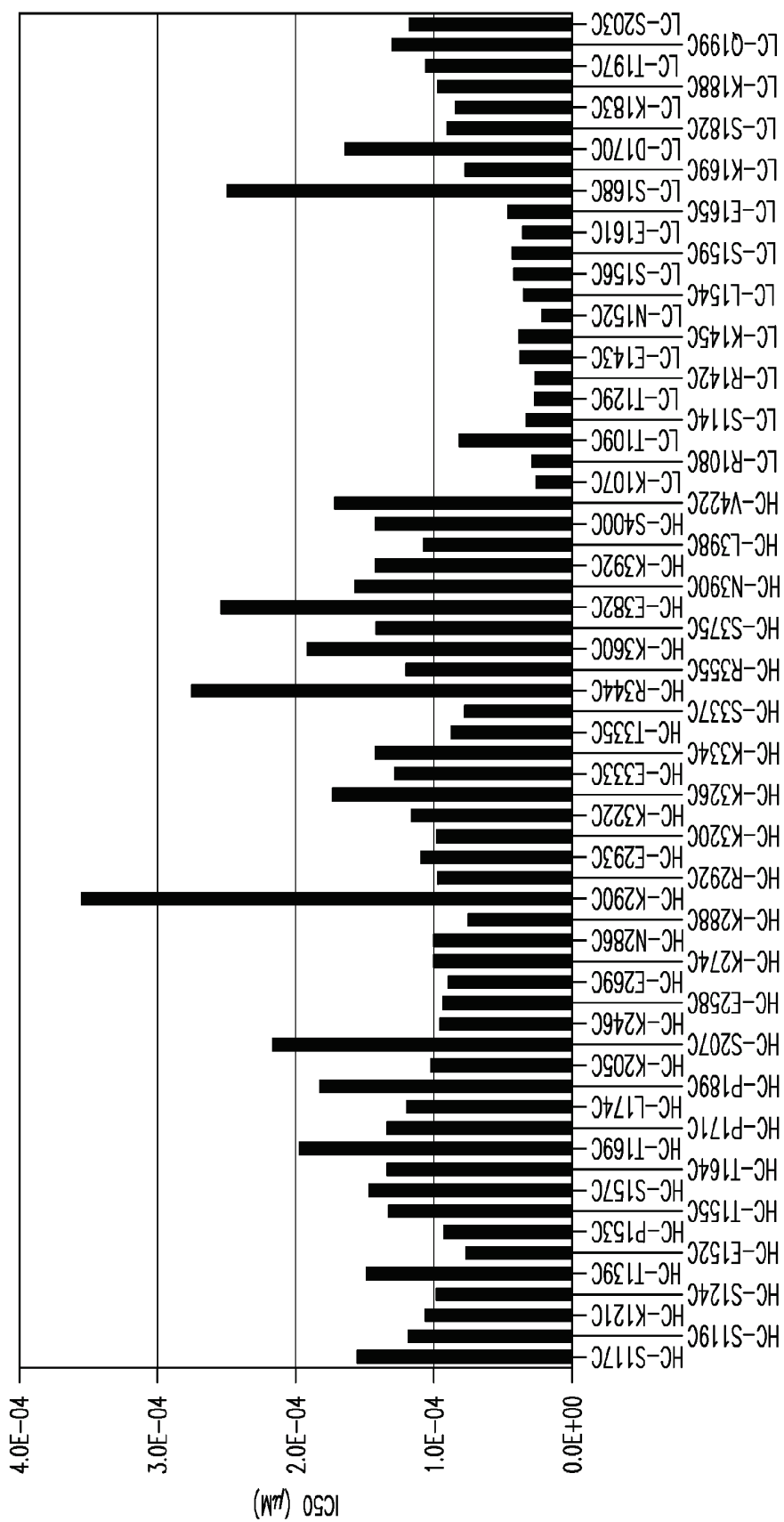


FIG. 16

18/44

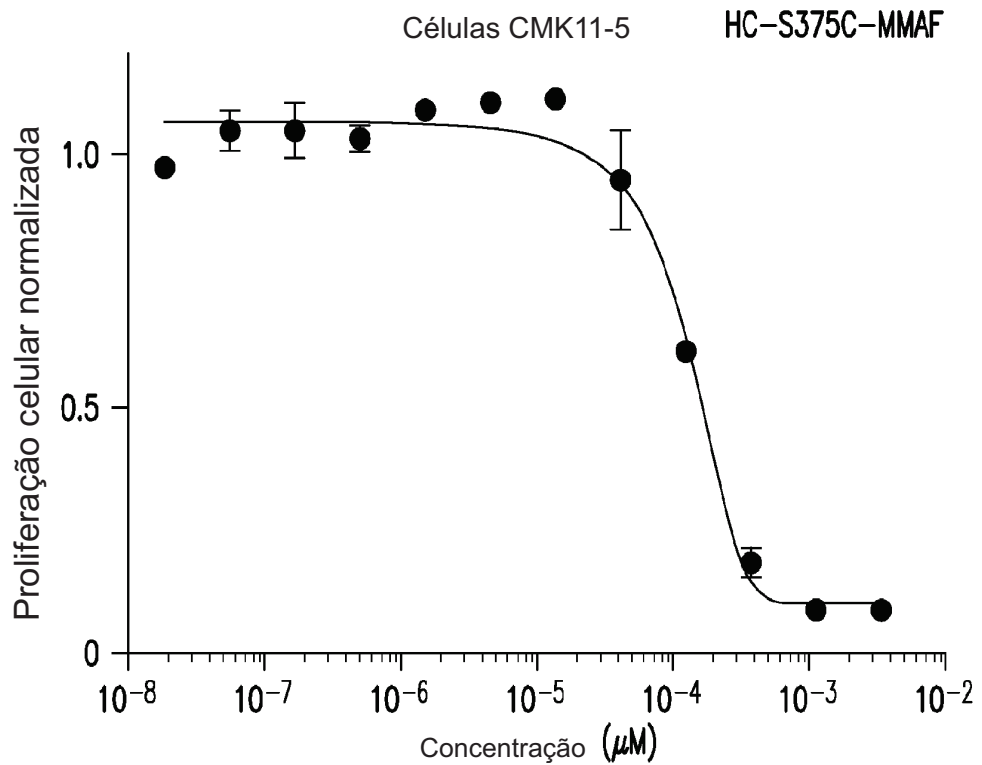


FIG.17A

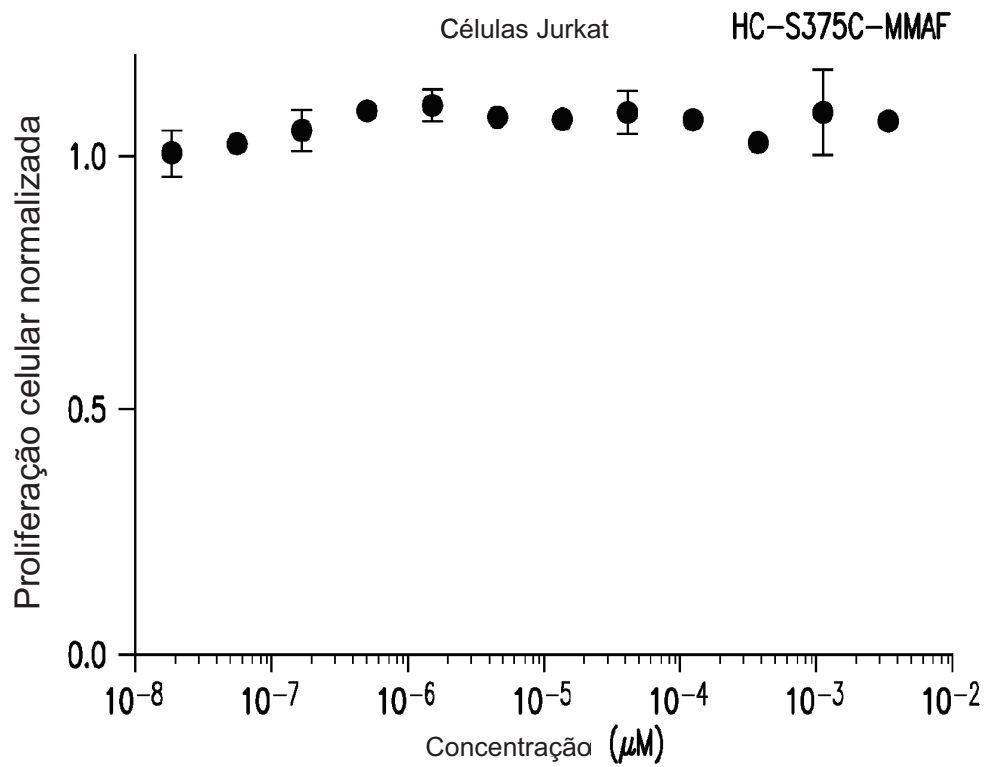


FIG.17B

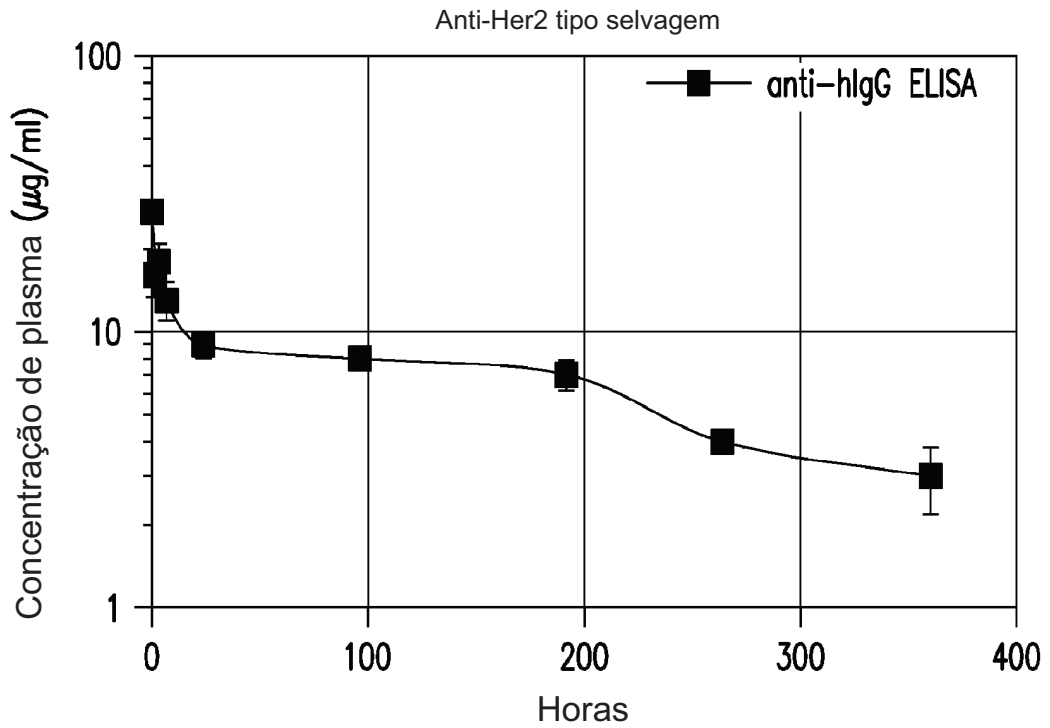


FIG. 18A

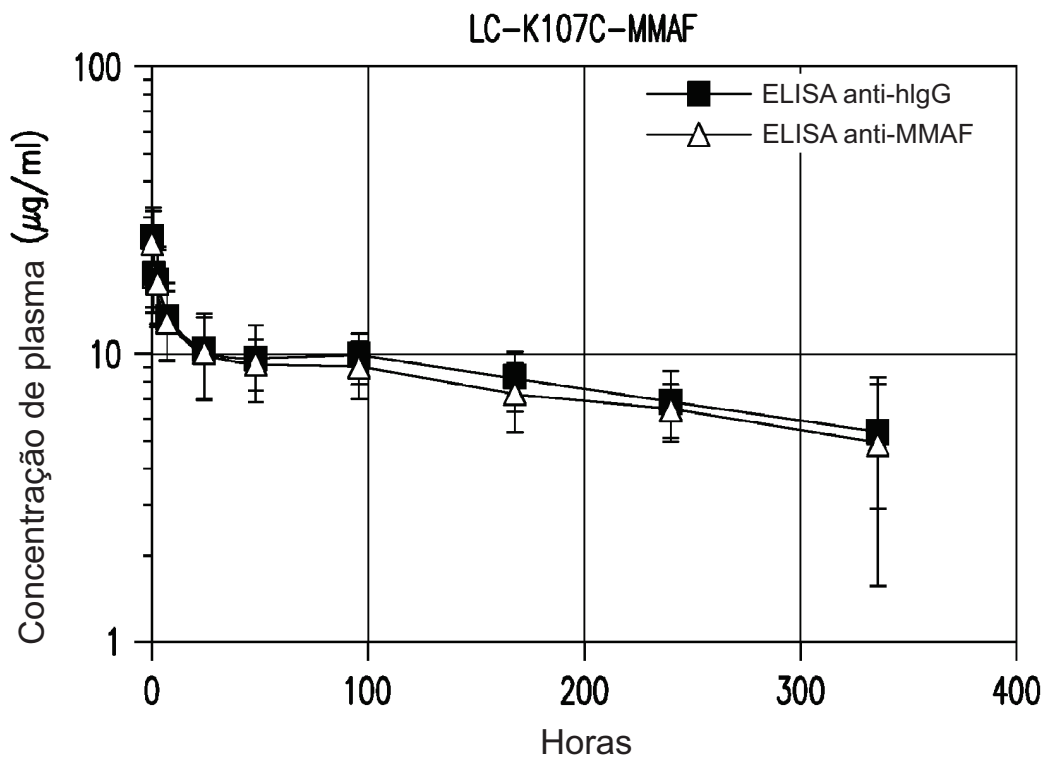
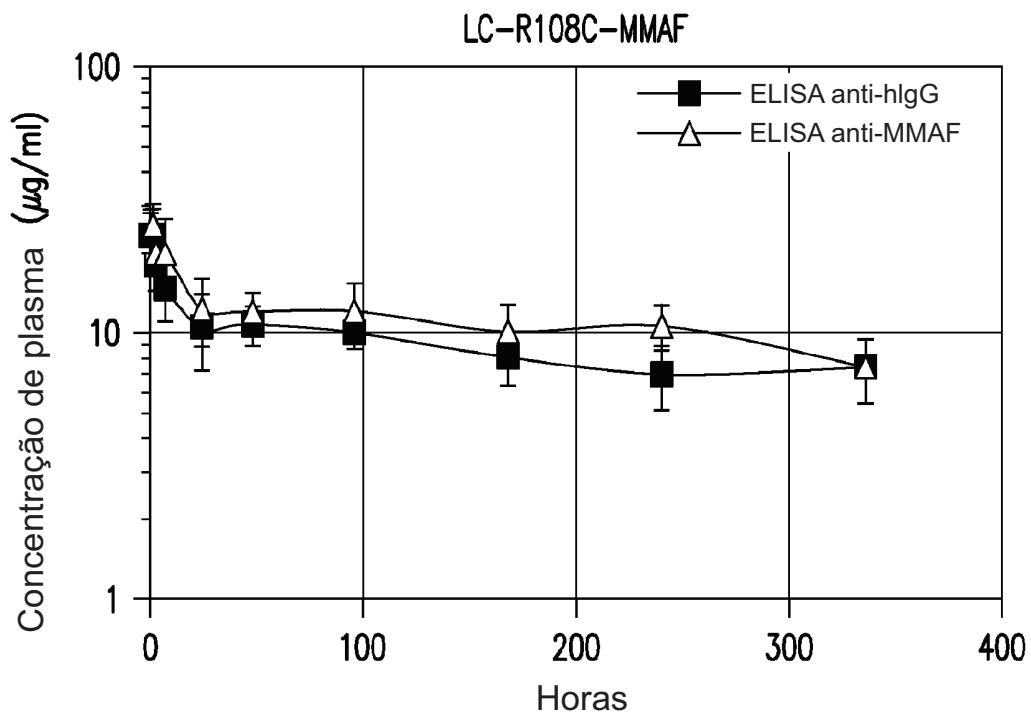
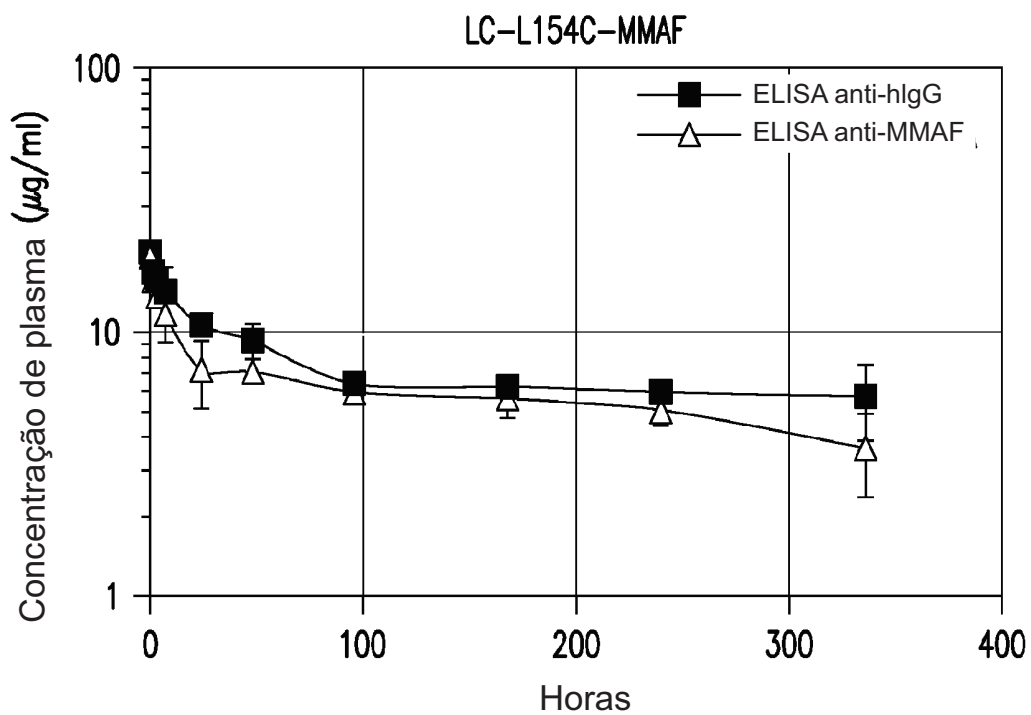


FIG. 18B

**FIG. 18C****FIG. 18D**

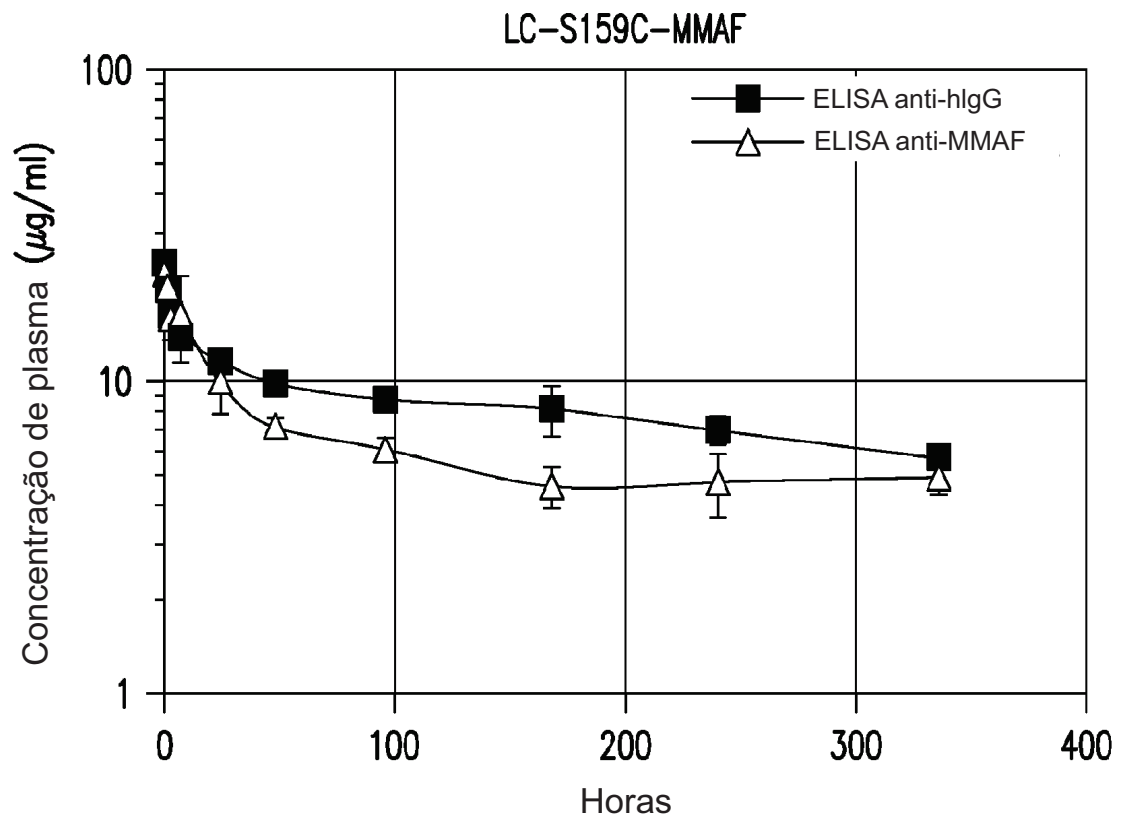


FIG. 18E

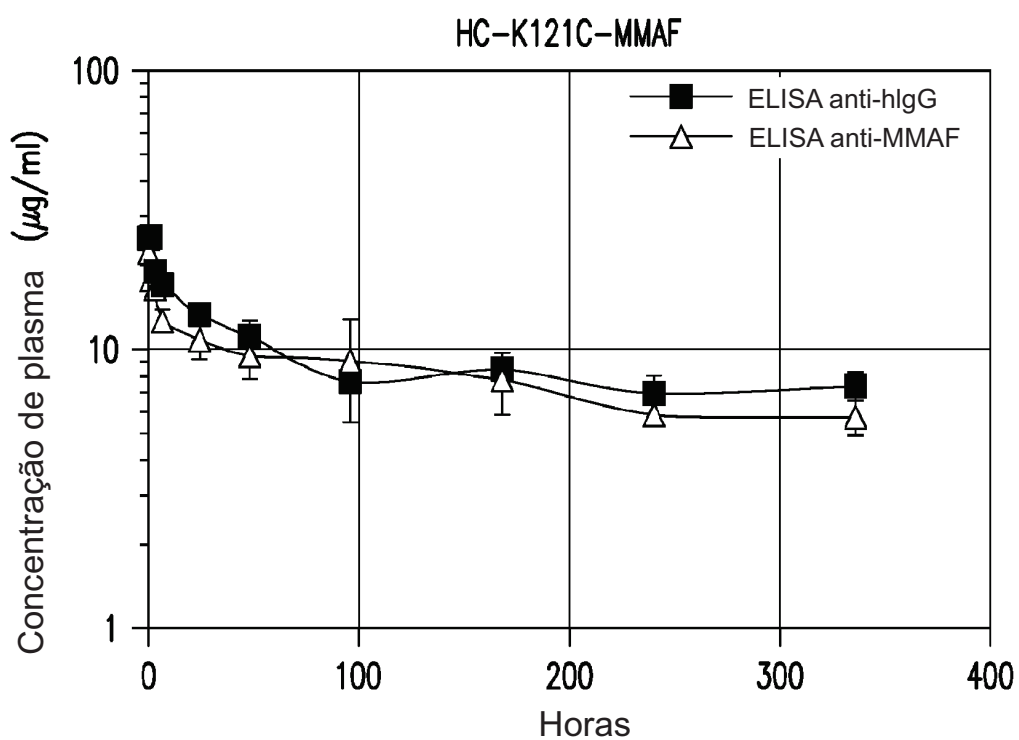


FIG. 19A

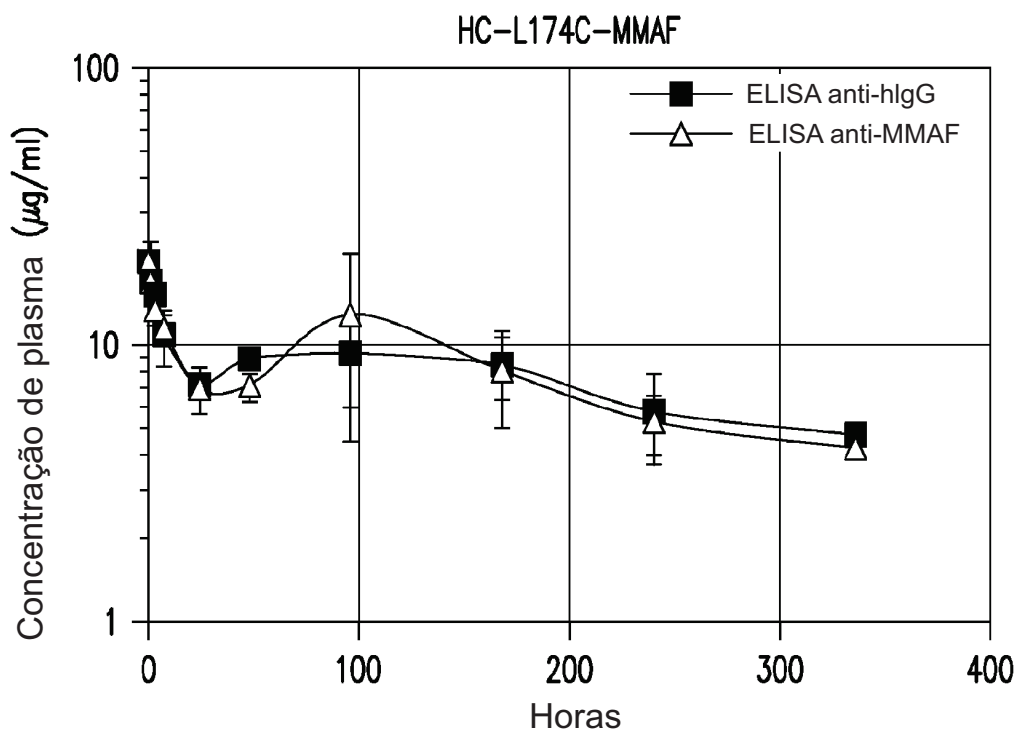


FIG. 19B

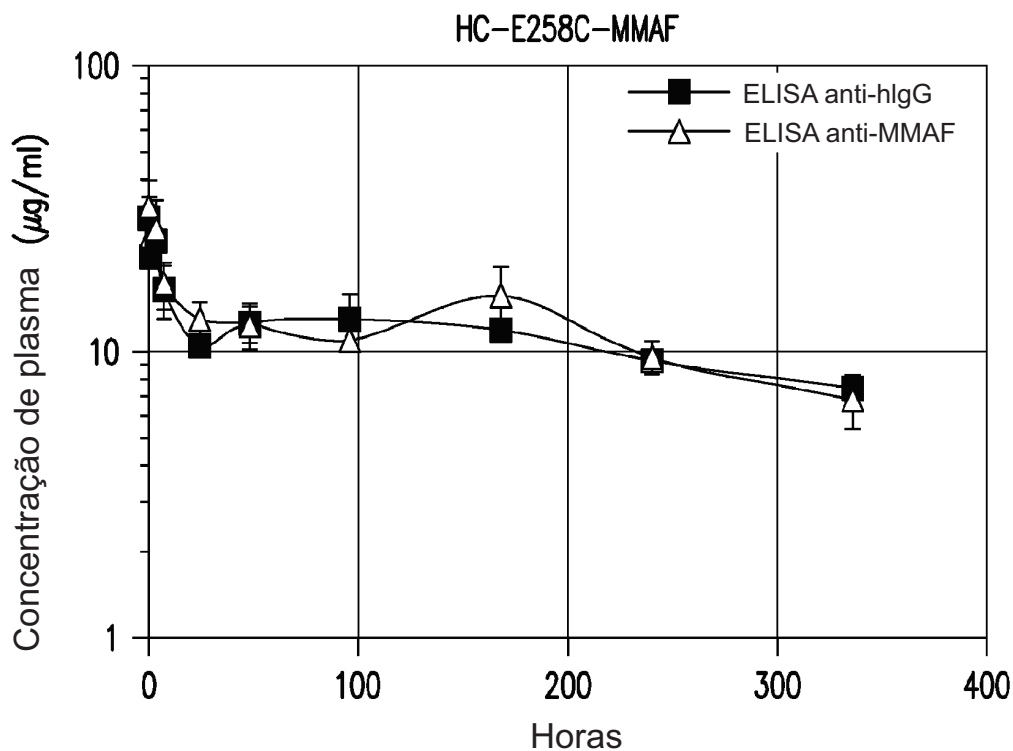


FIG. 19C

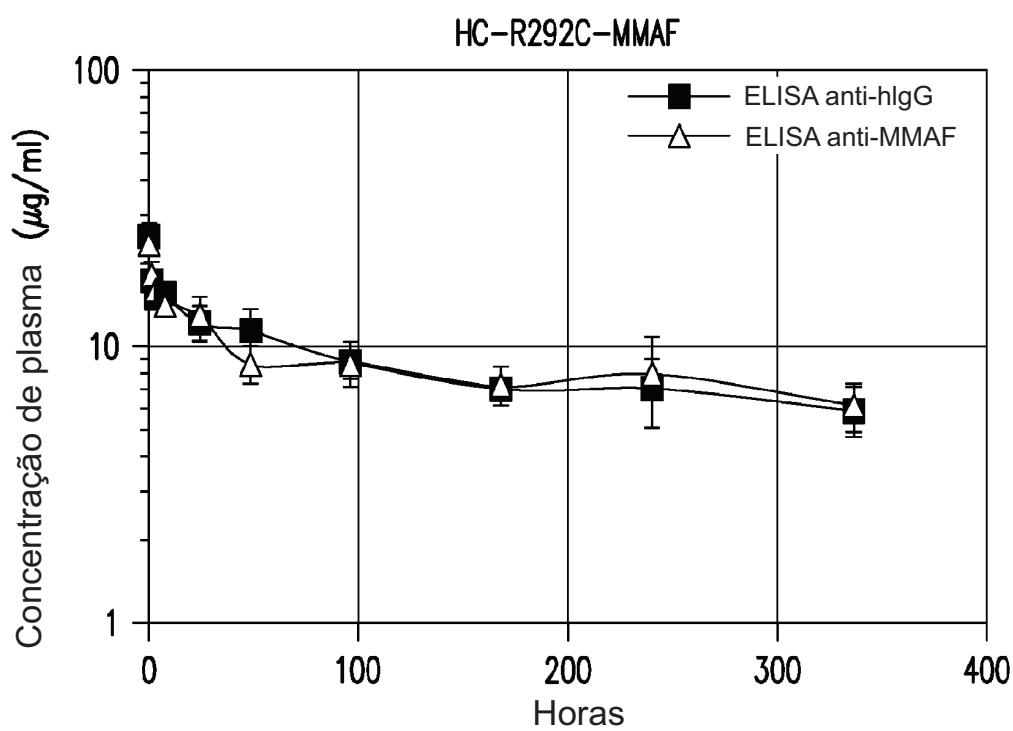


FIG. 19D

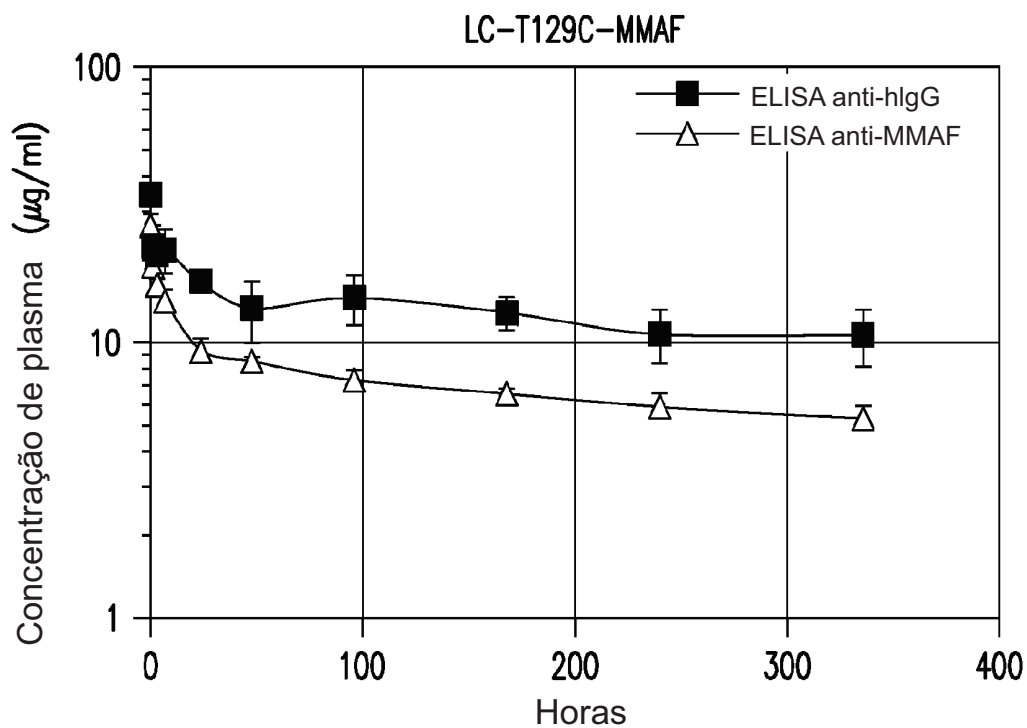


FIG.20A

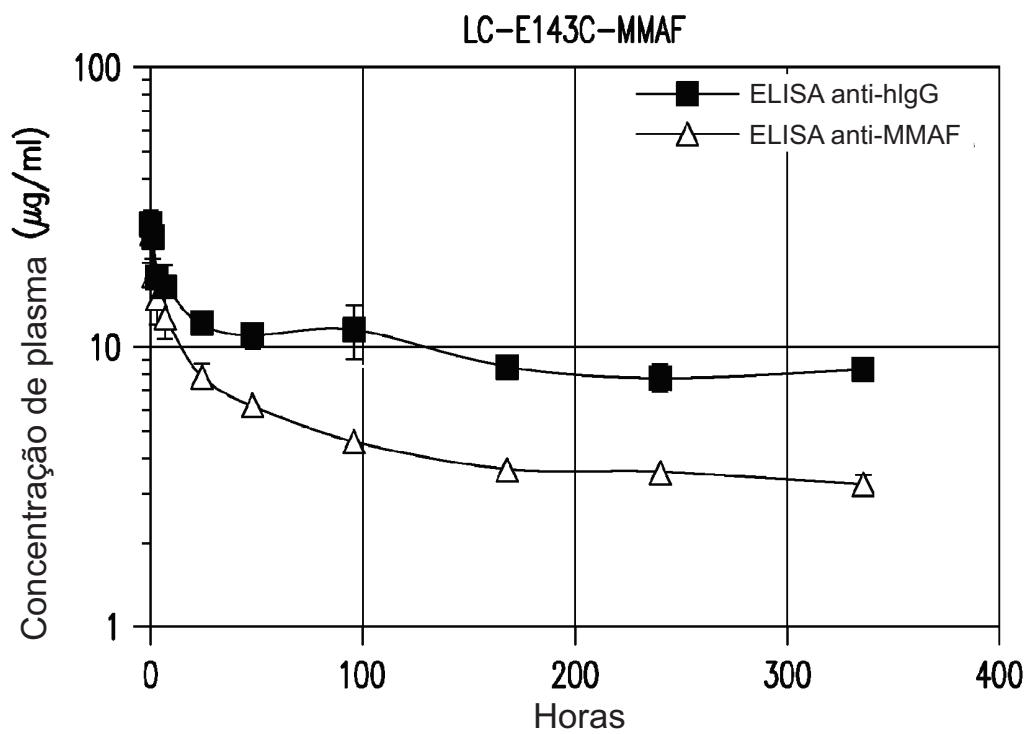


FIG.20B

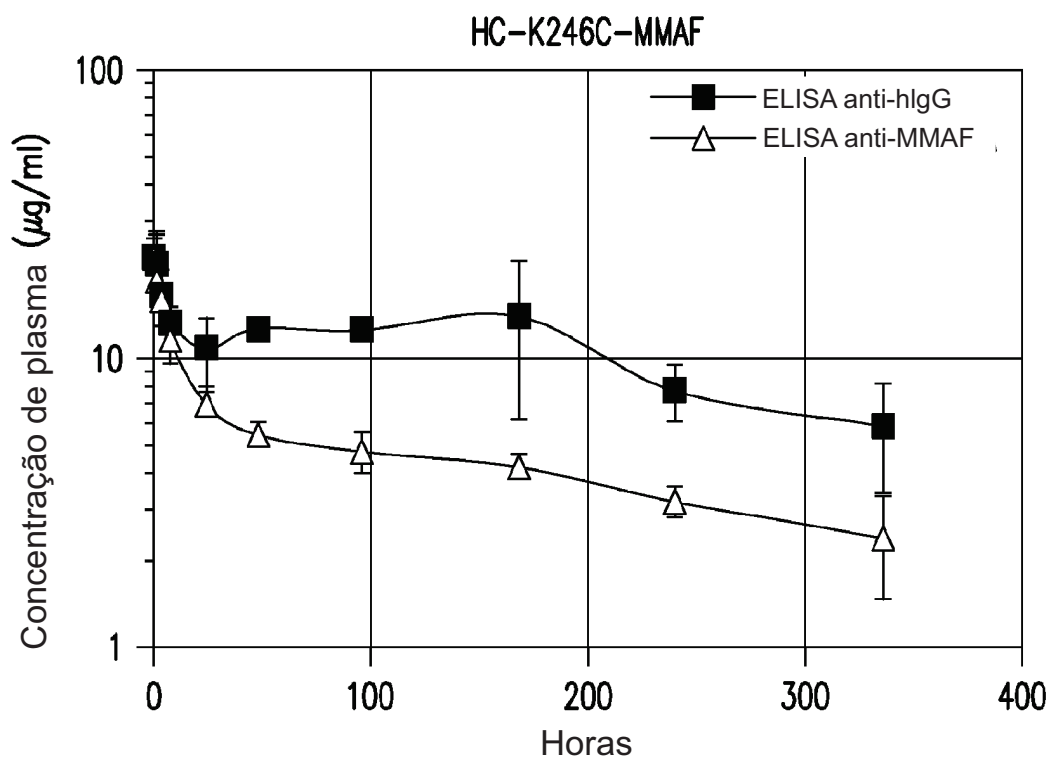


FIG.20C

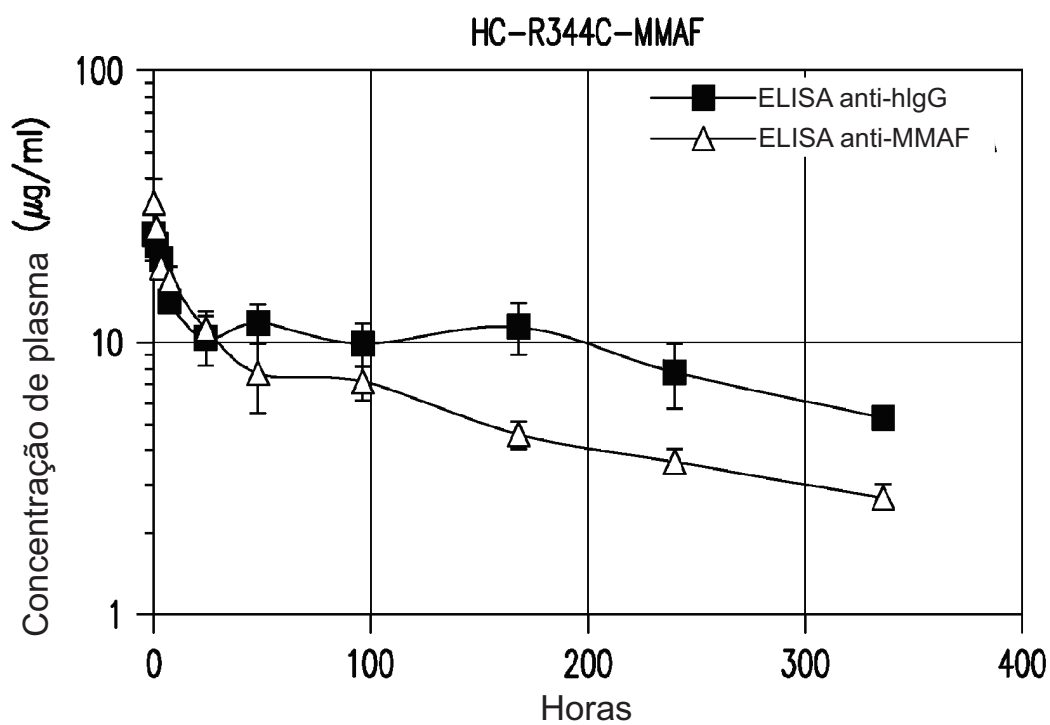


FIG.20D

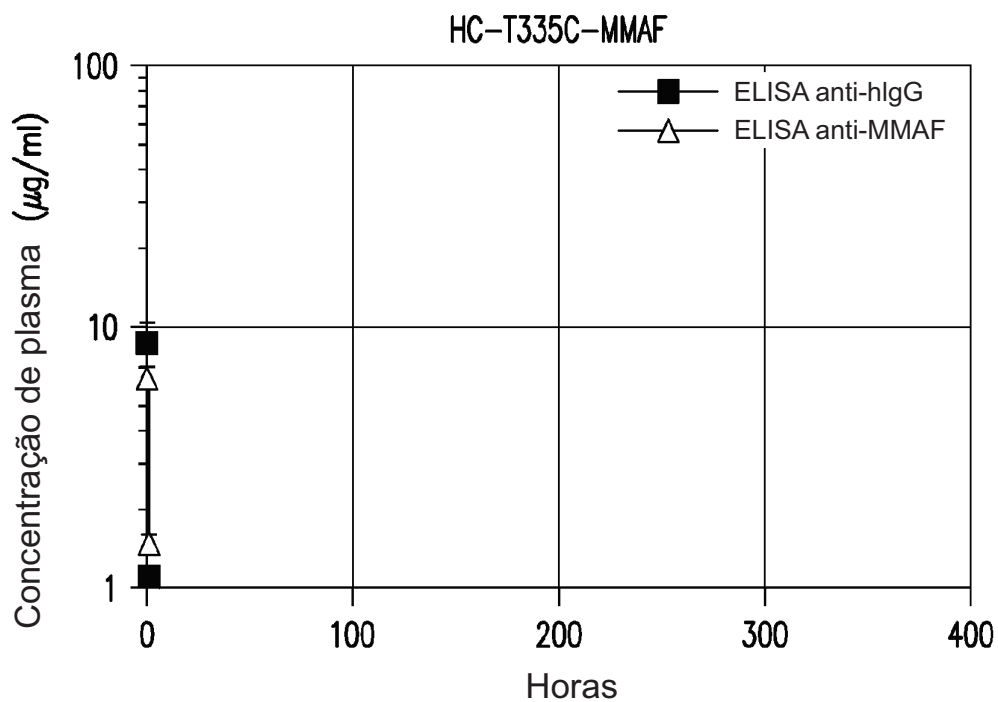


FIG.21A

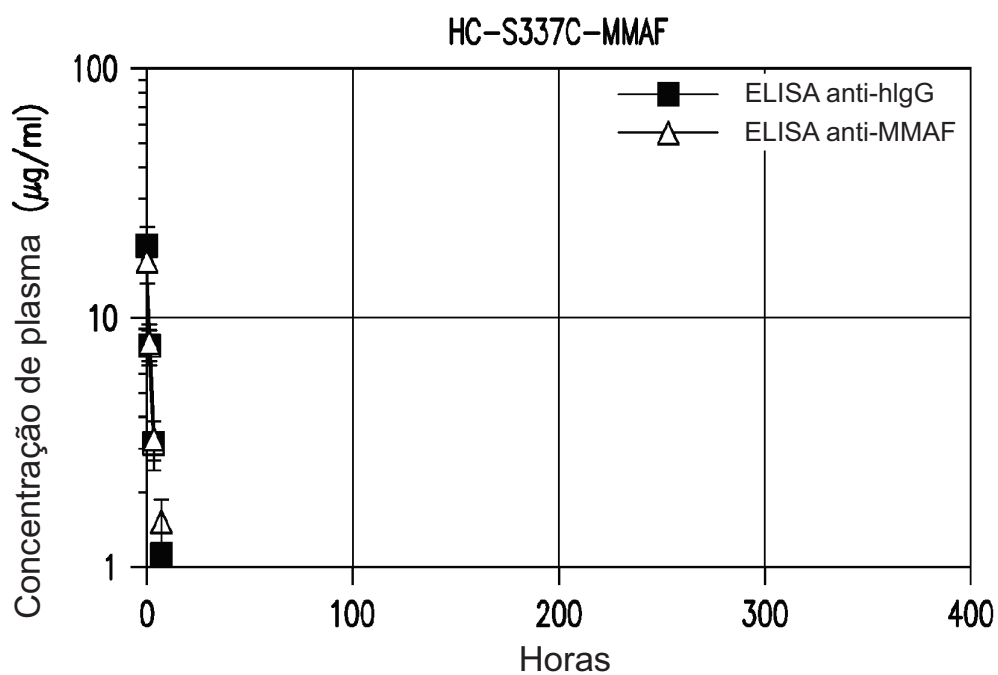


FIG.21B

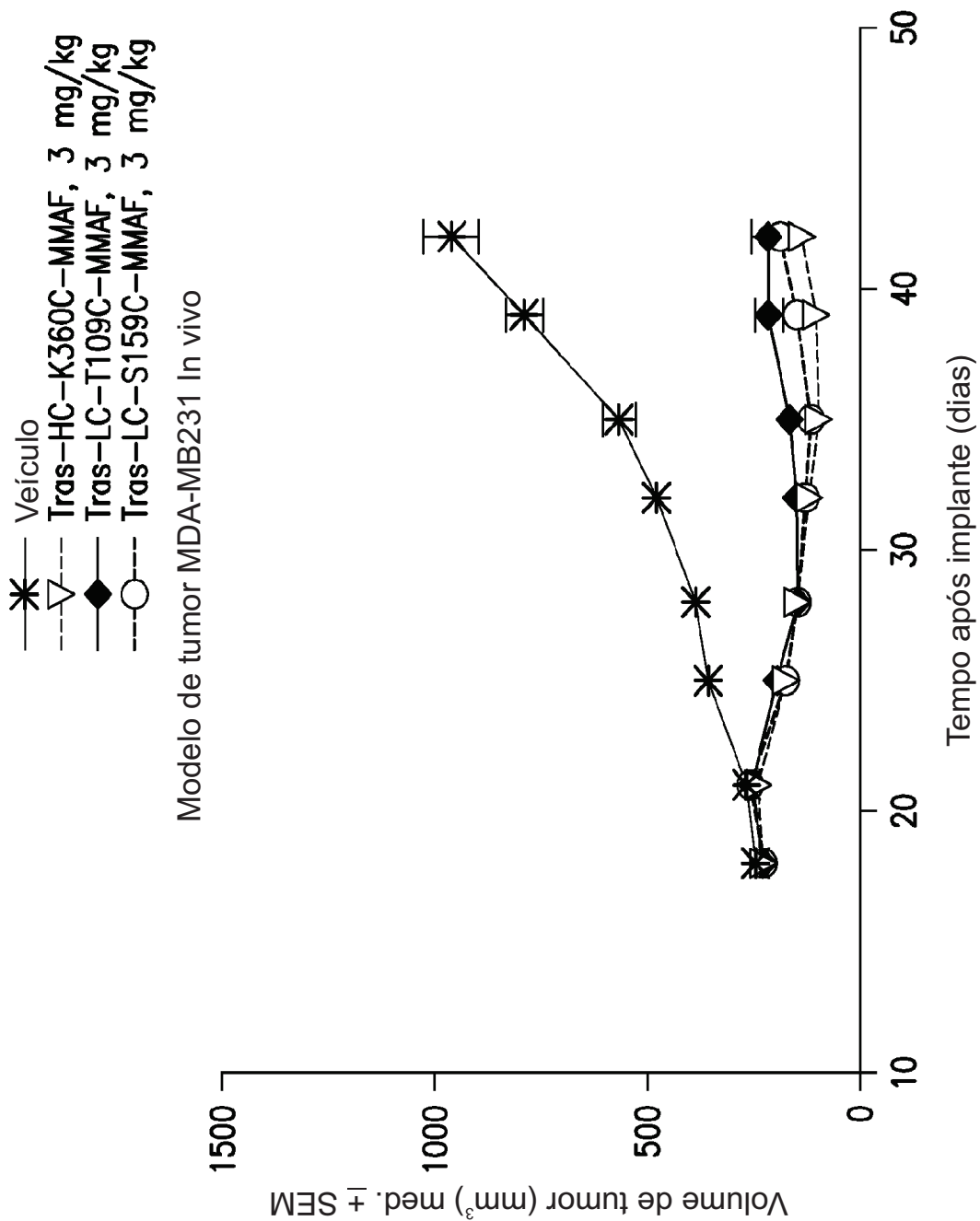


FIG.22

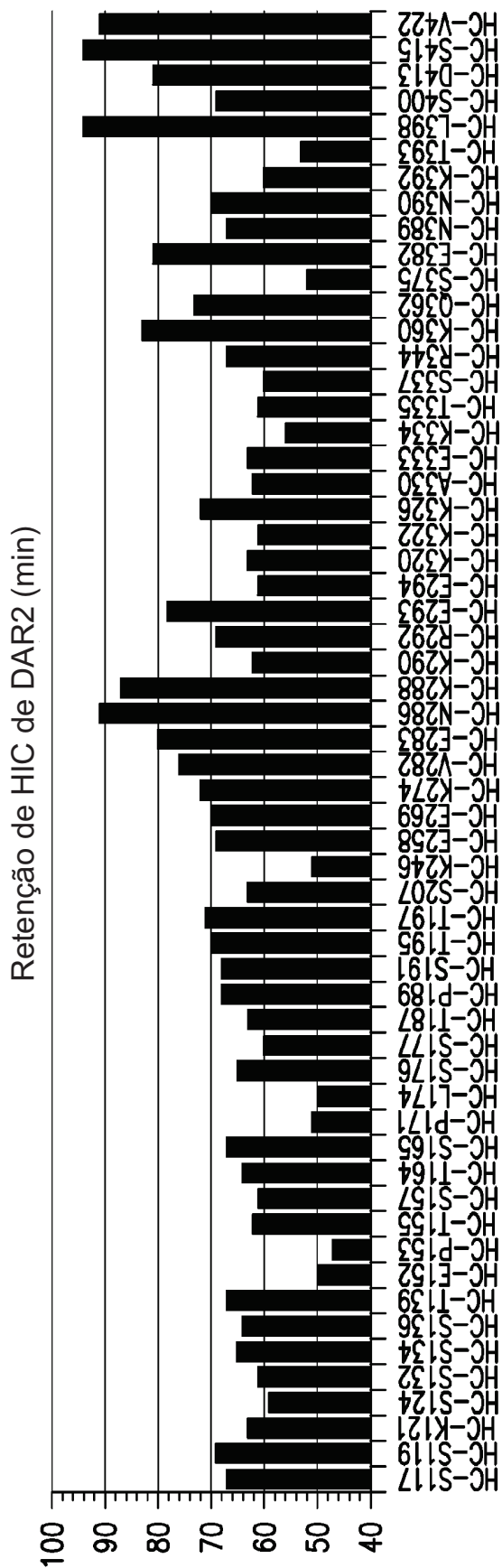


FIG. 23A

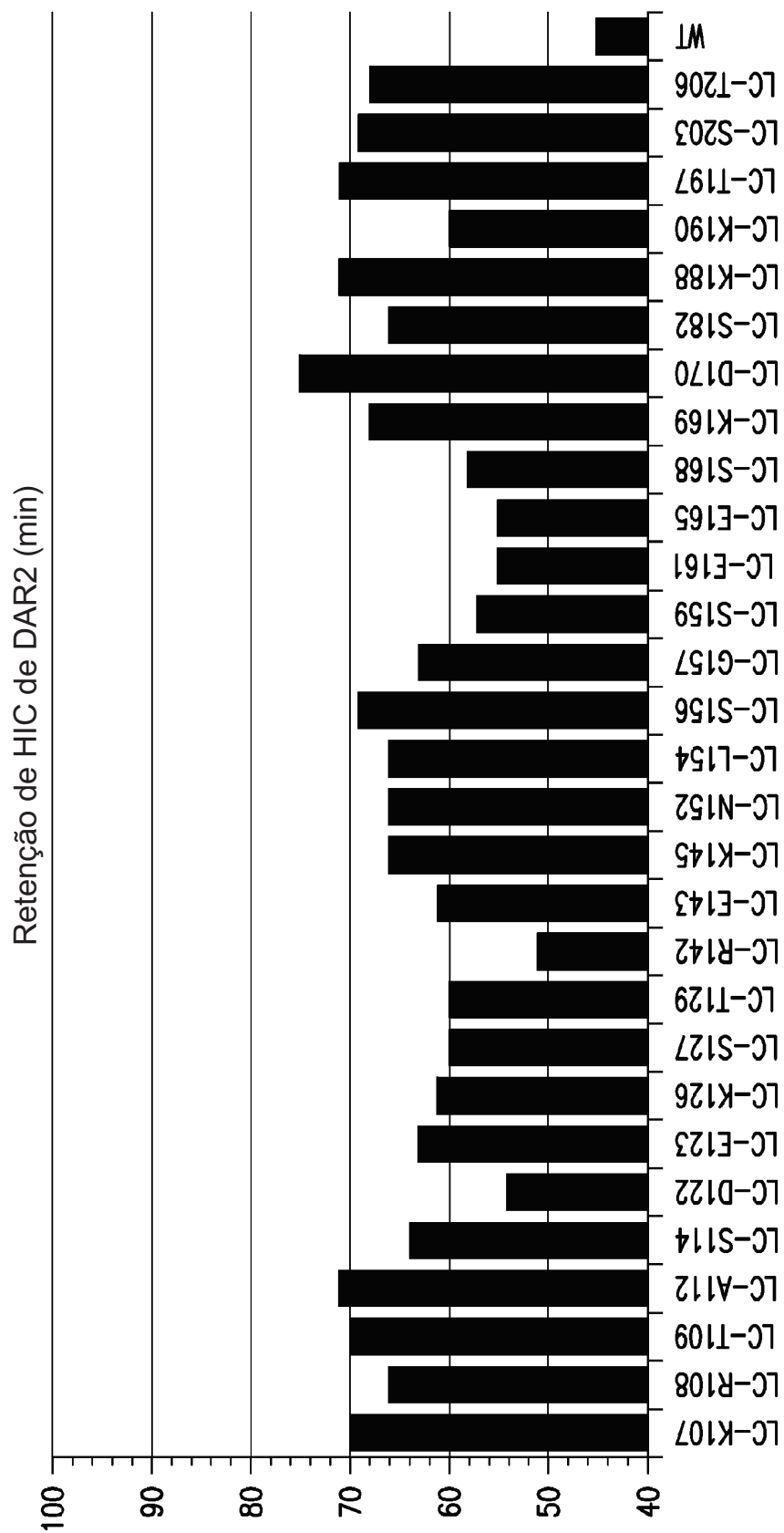


FIG. 23B

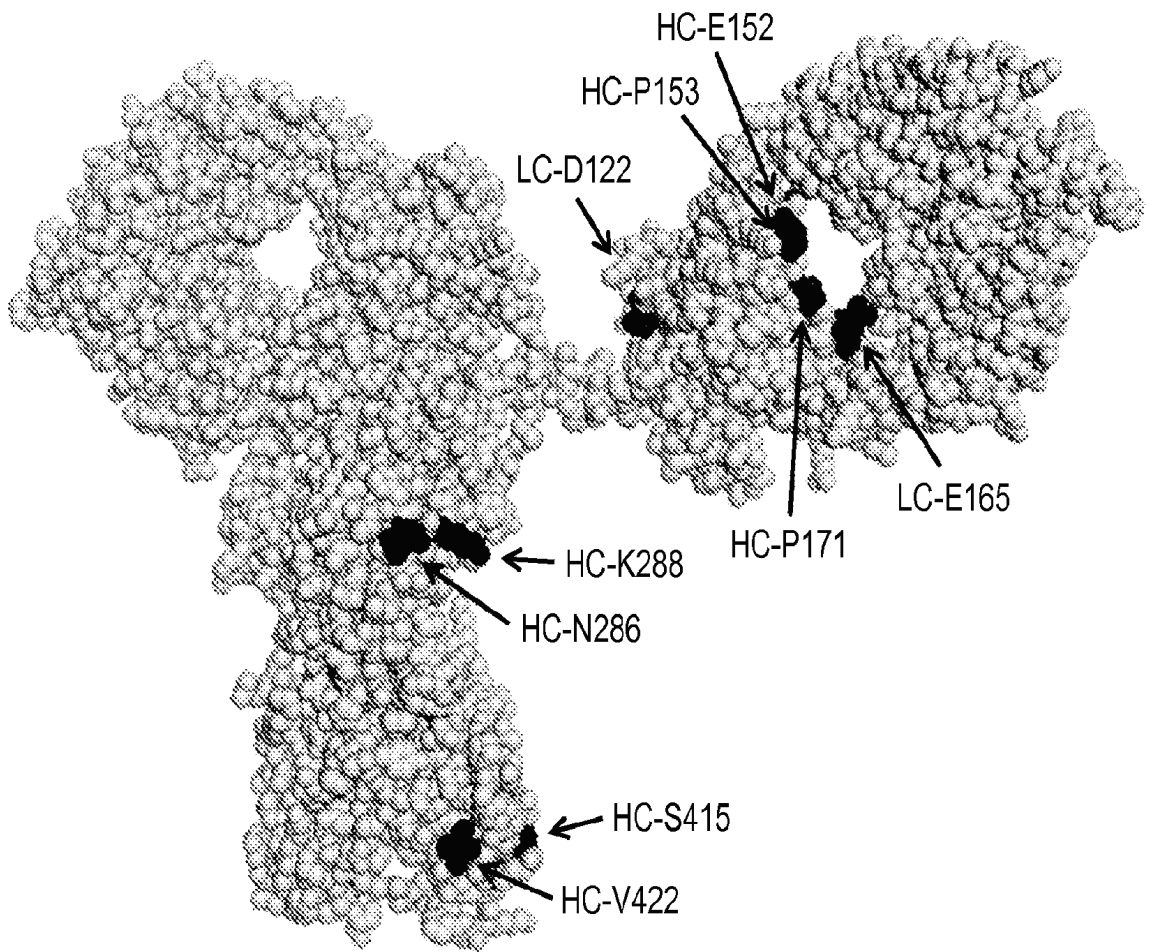


FIG.24A

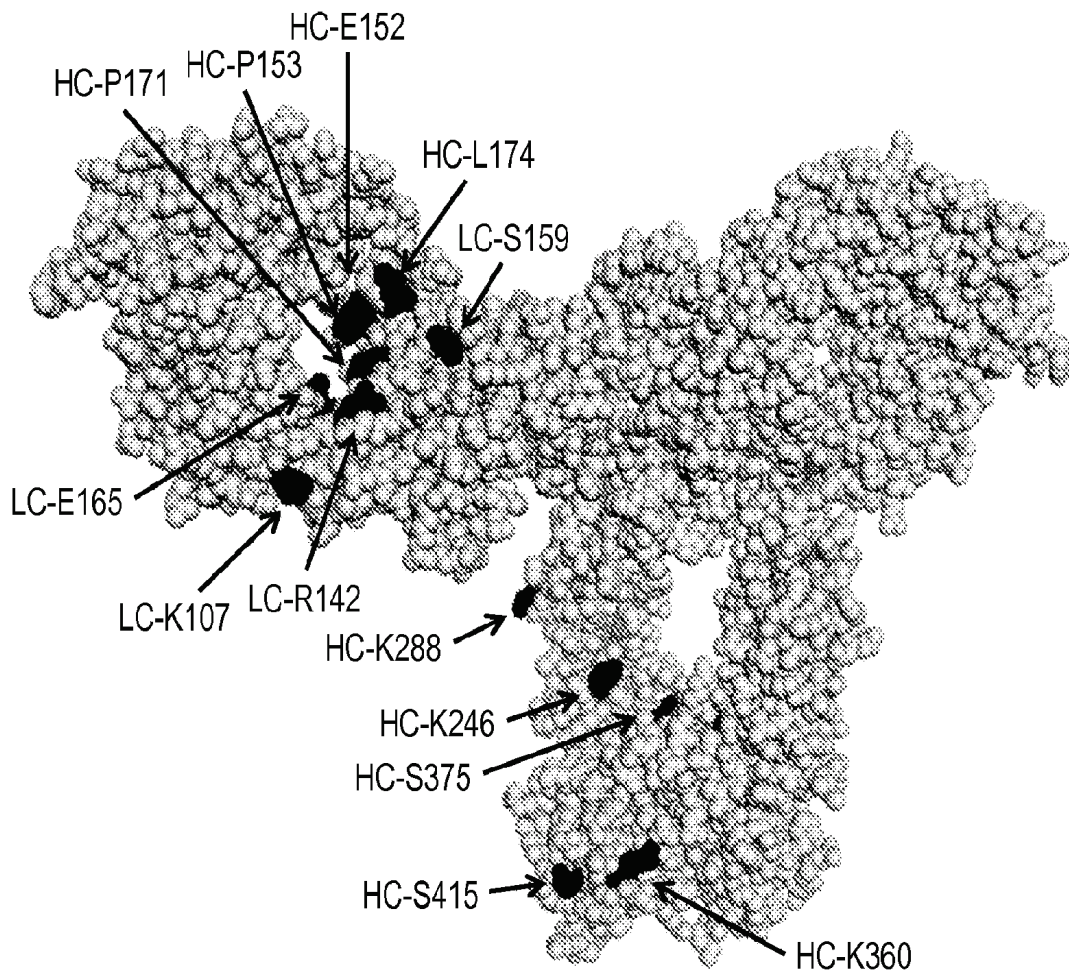


FIG.24B

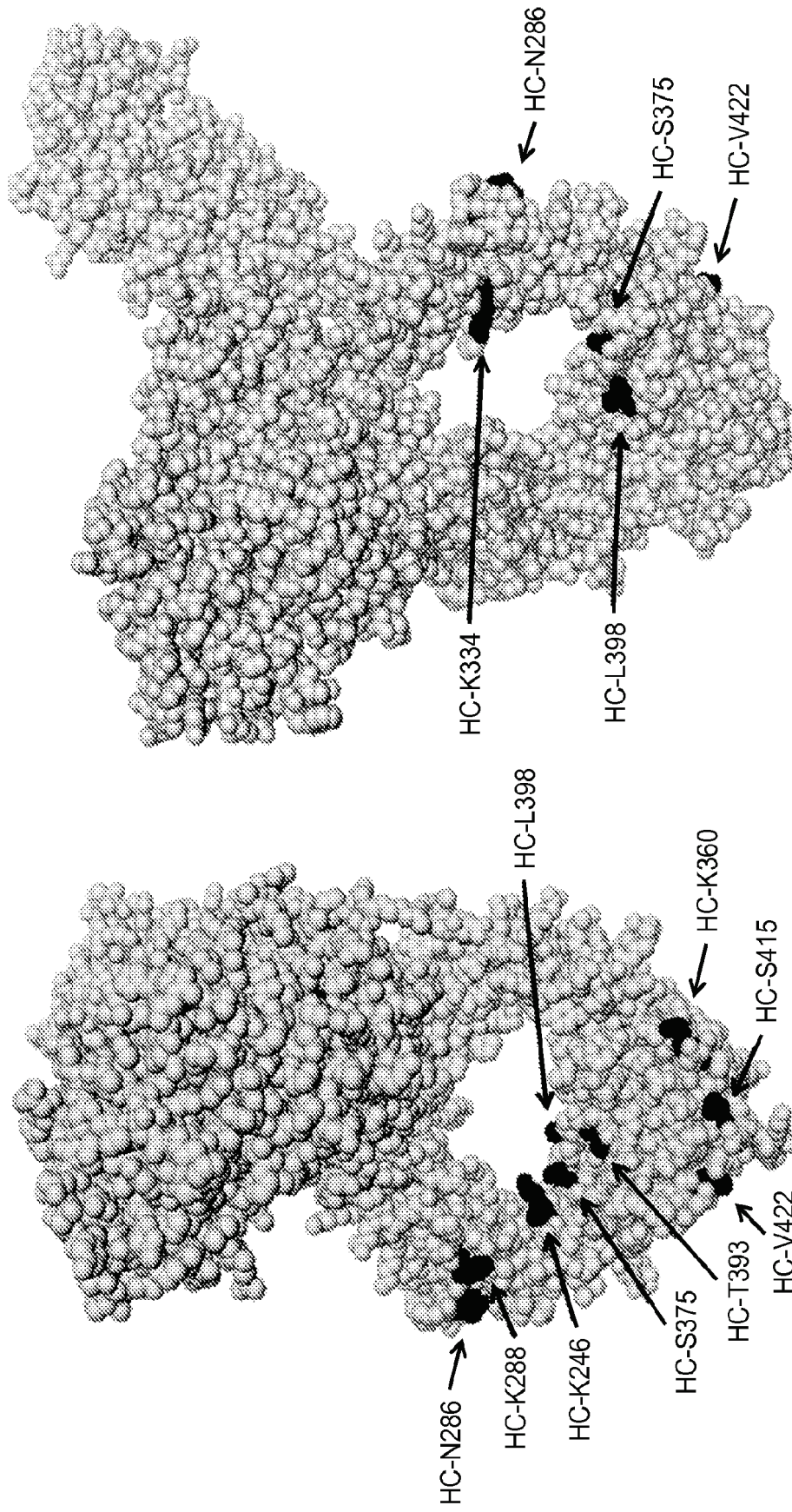


FIG. 24C

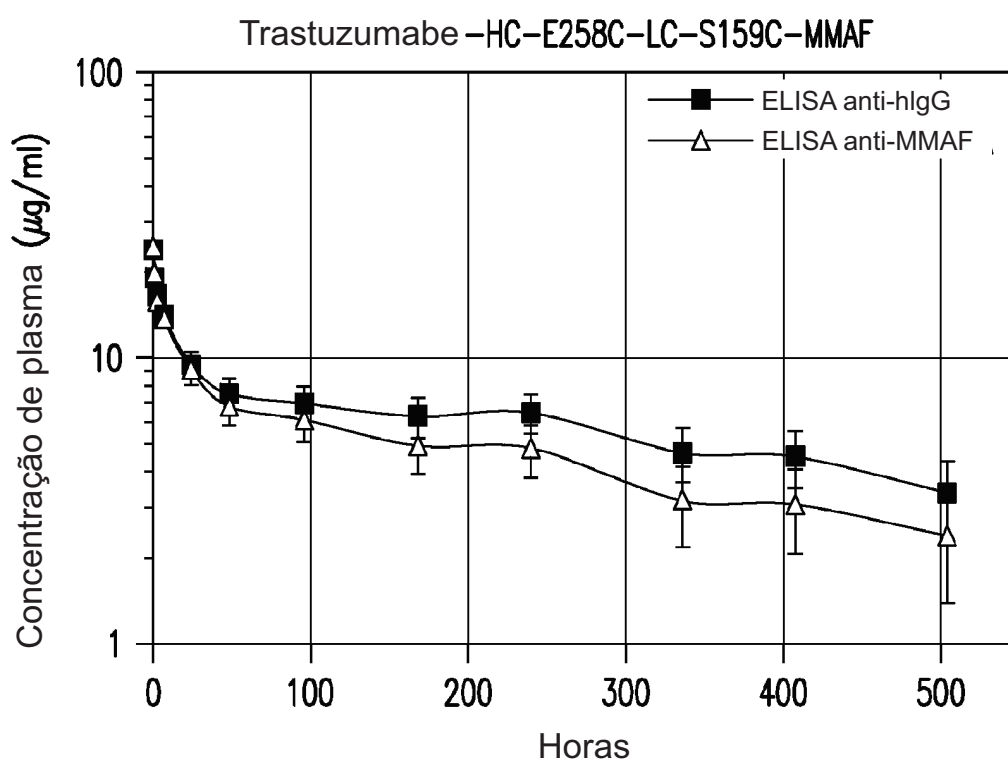


FIG.25A

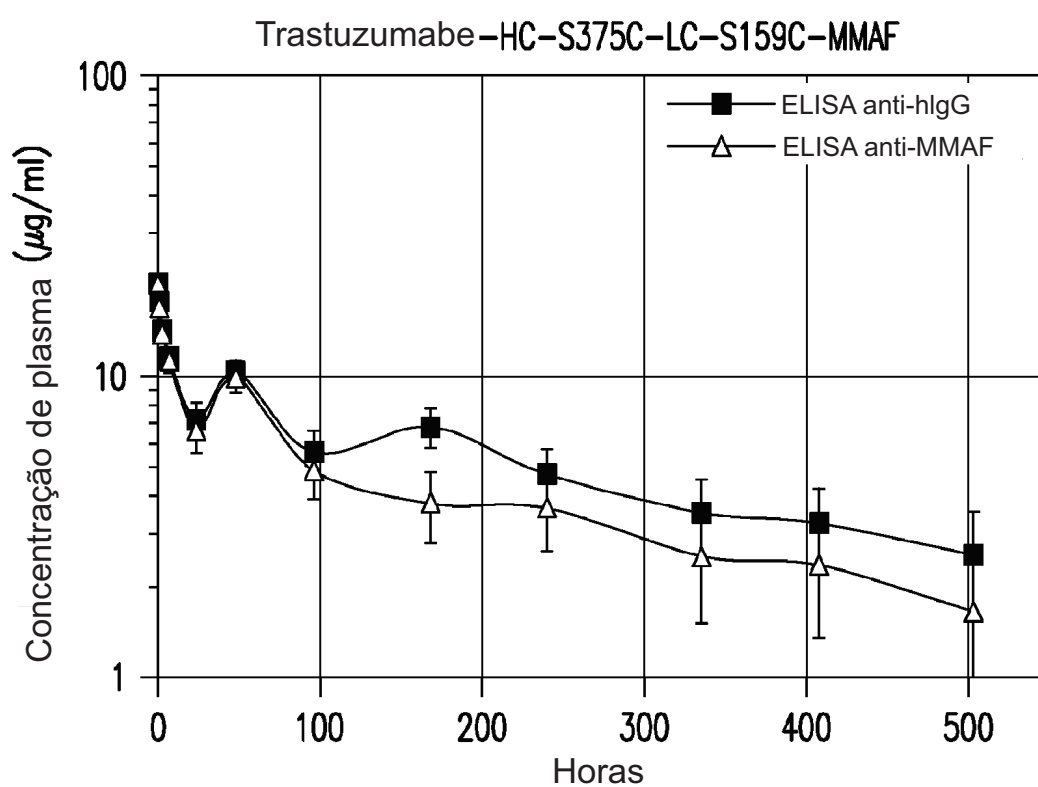


FIG.25B

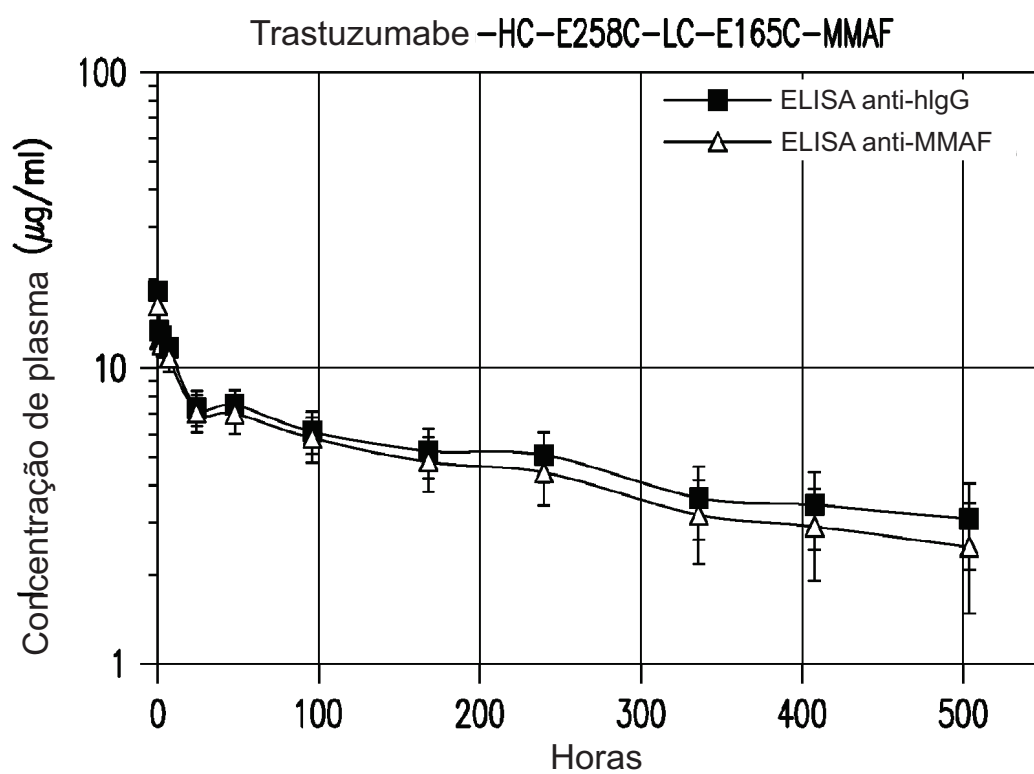


FIG.25C

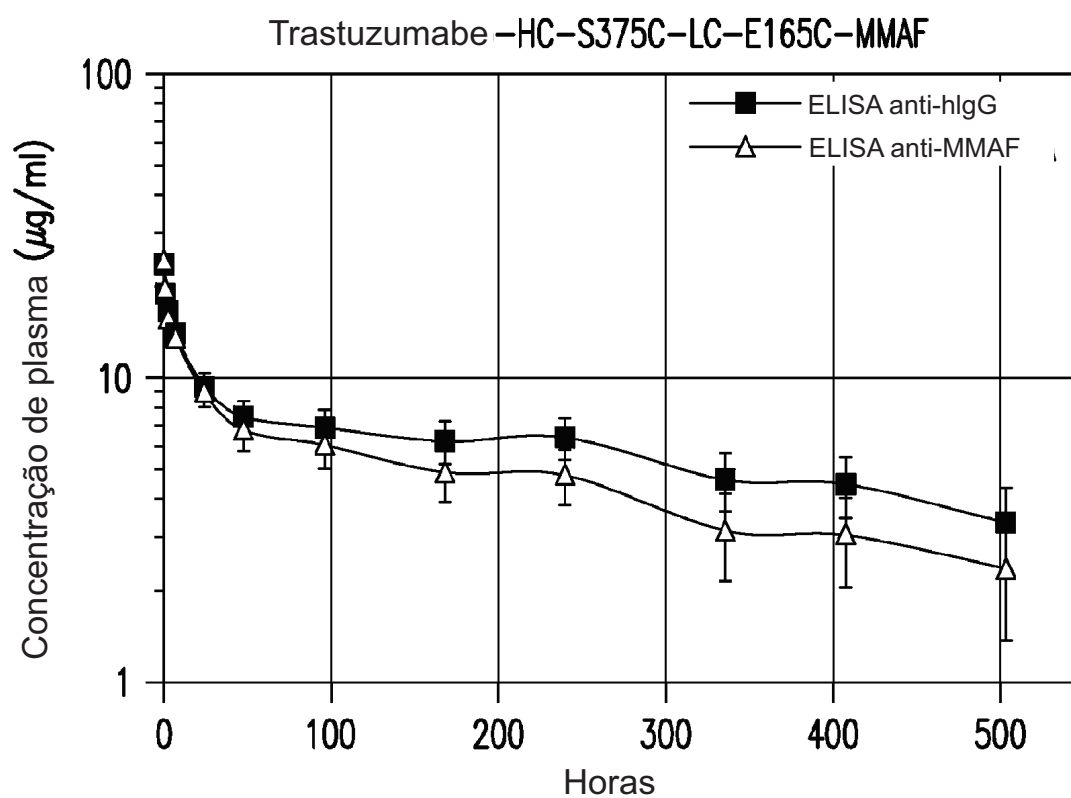


FIG.25D

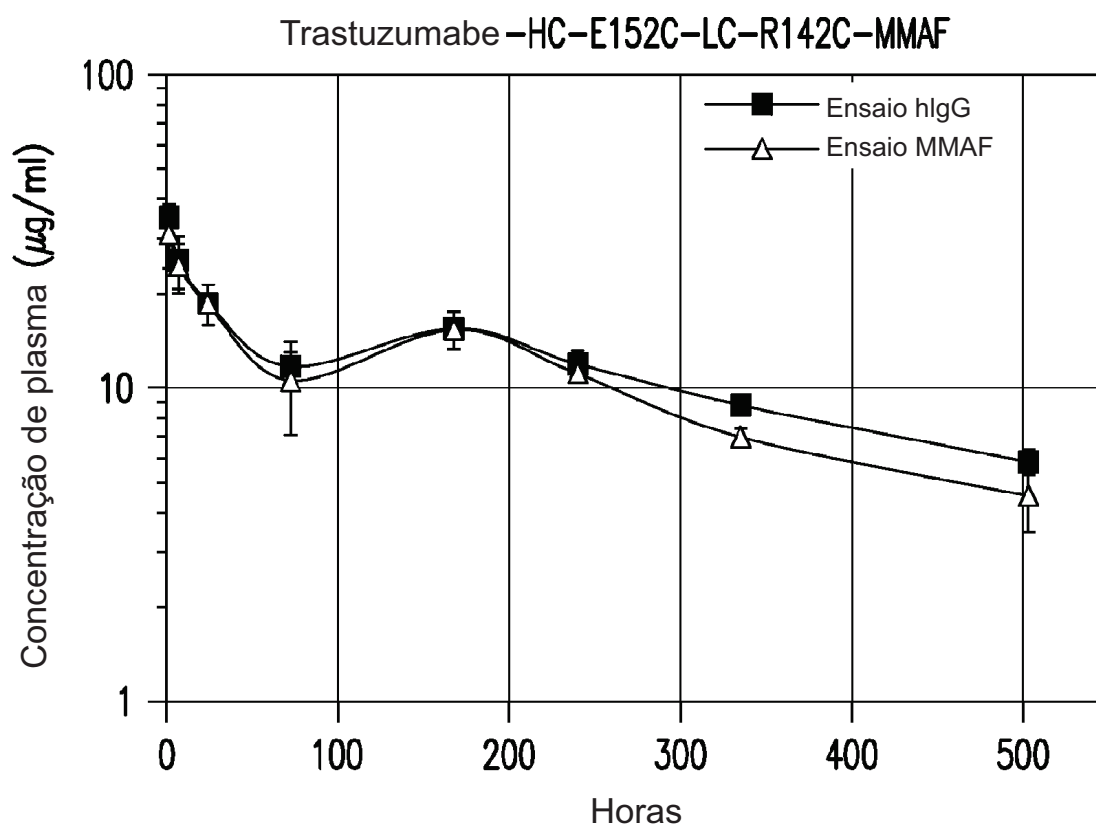


FIG.25E

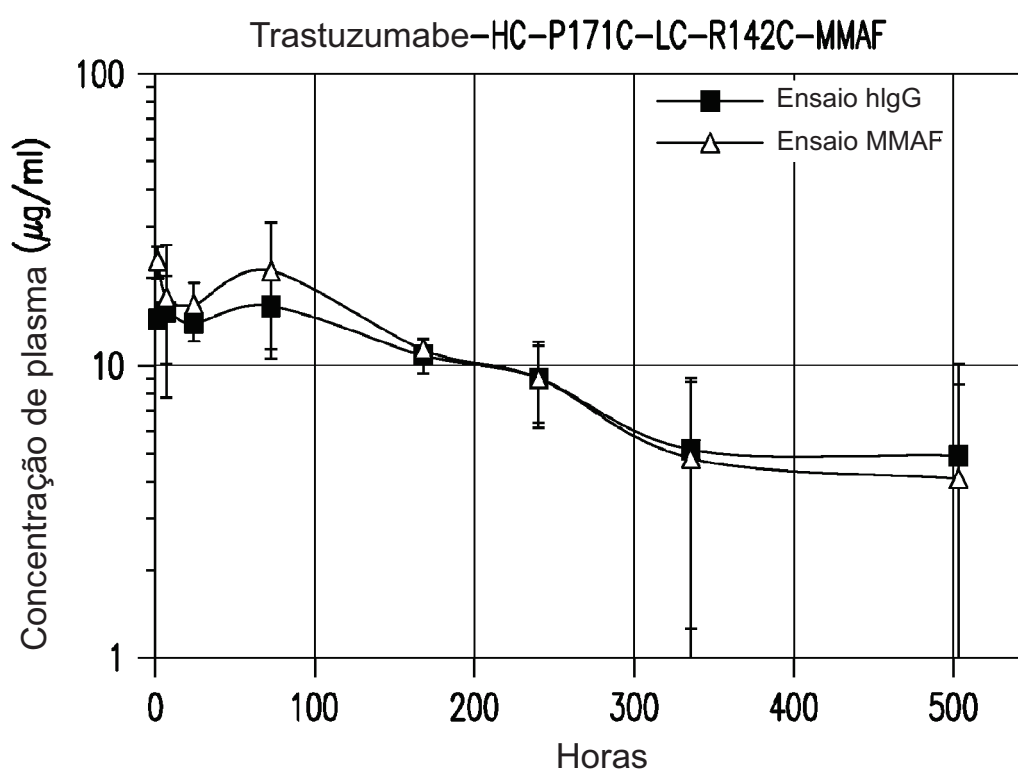


FIG.25F

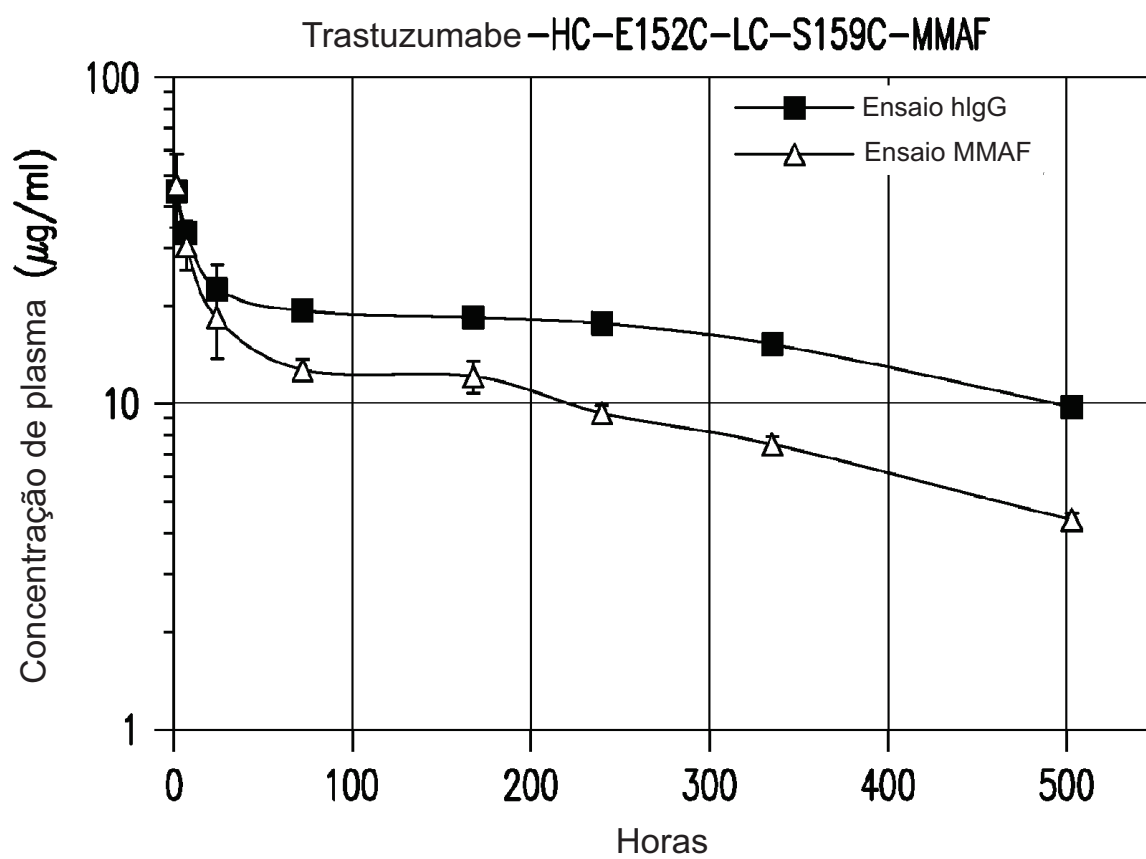


FIG.25G

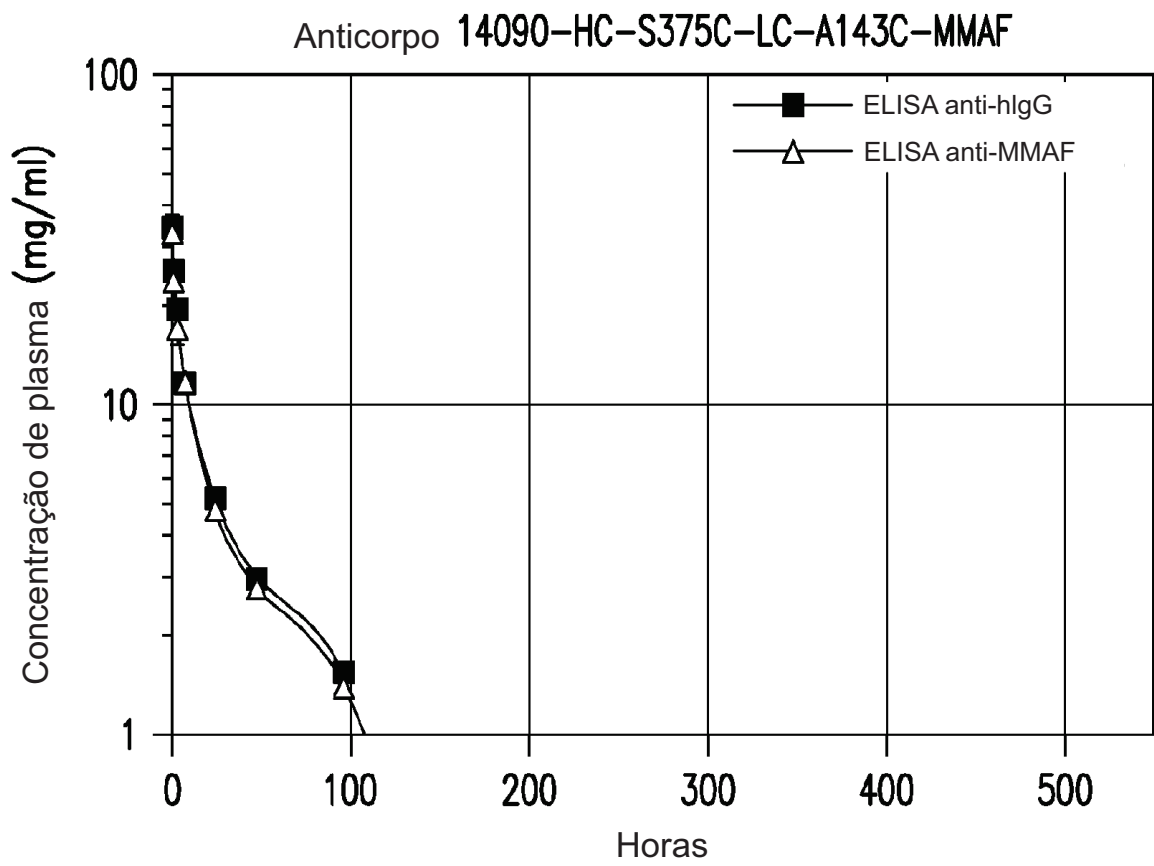


FIG.25H

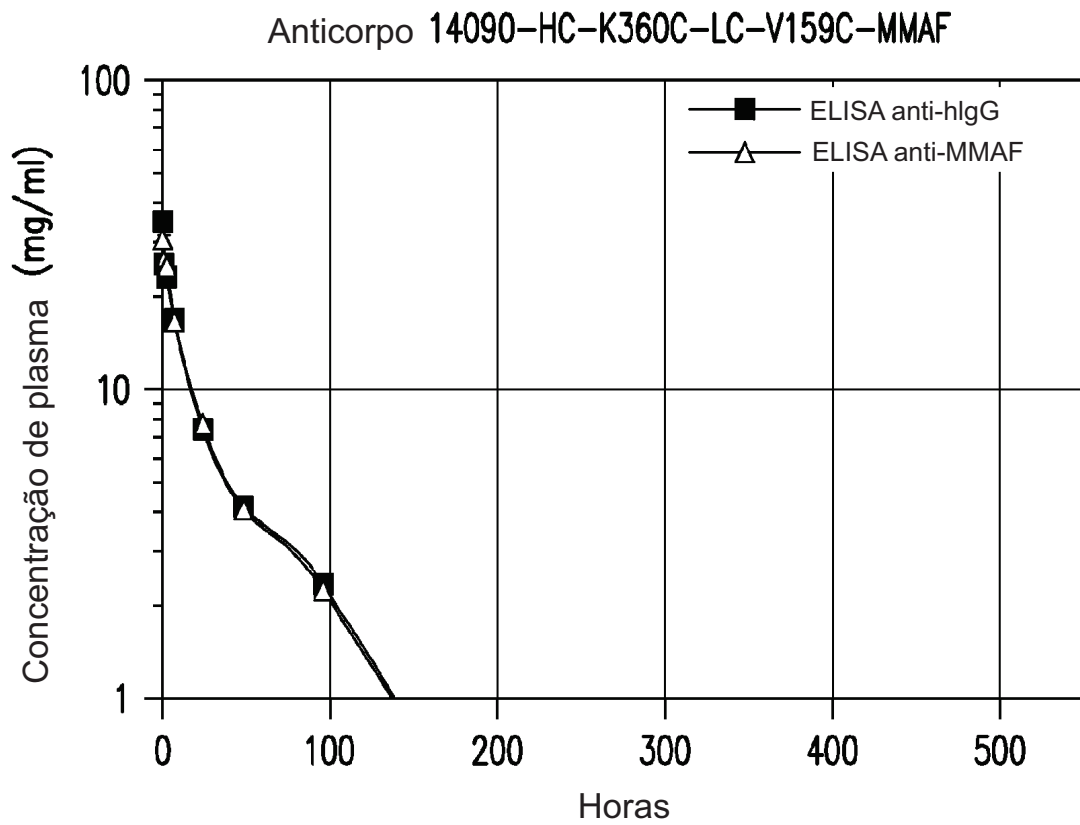


FIG.25I

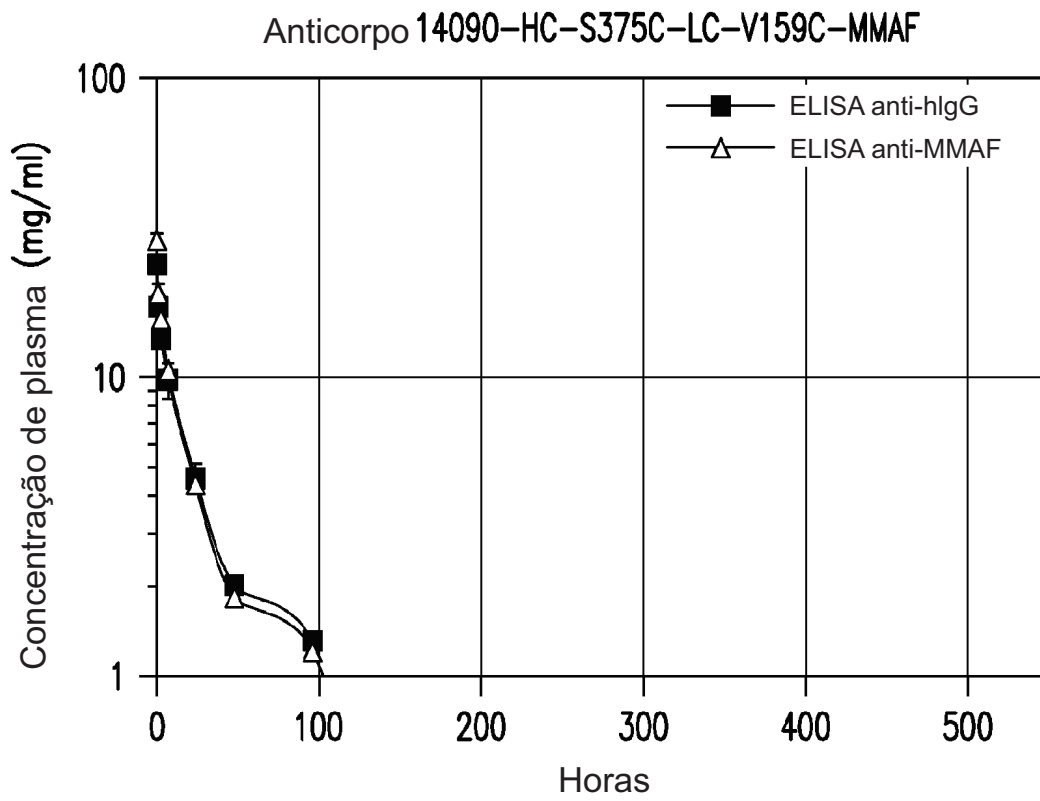


FIG.25J

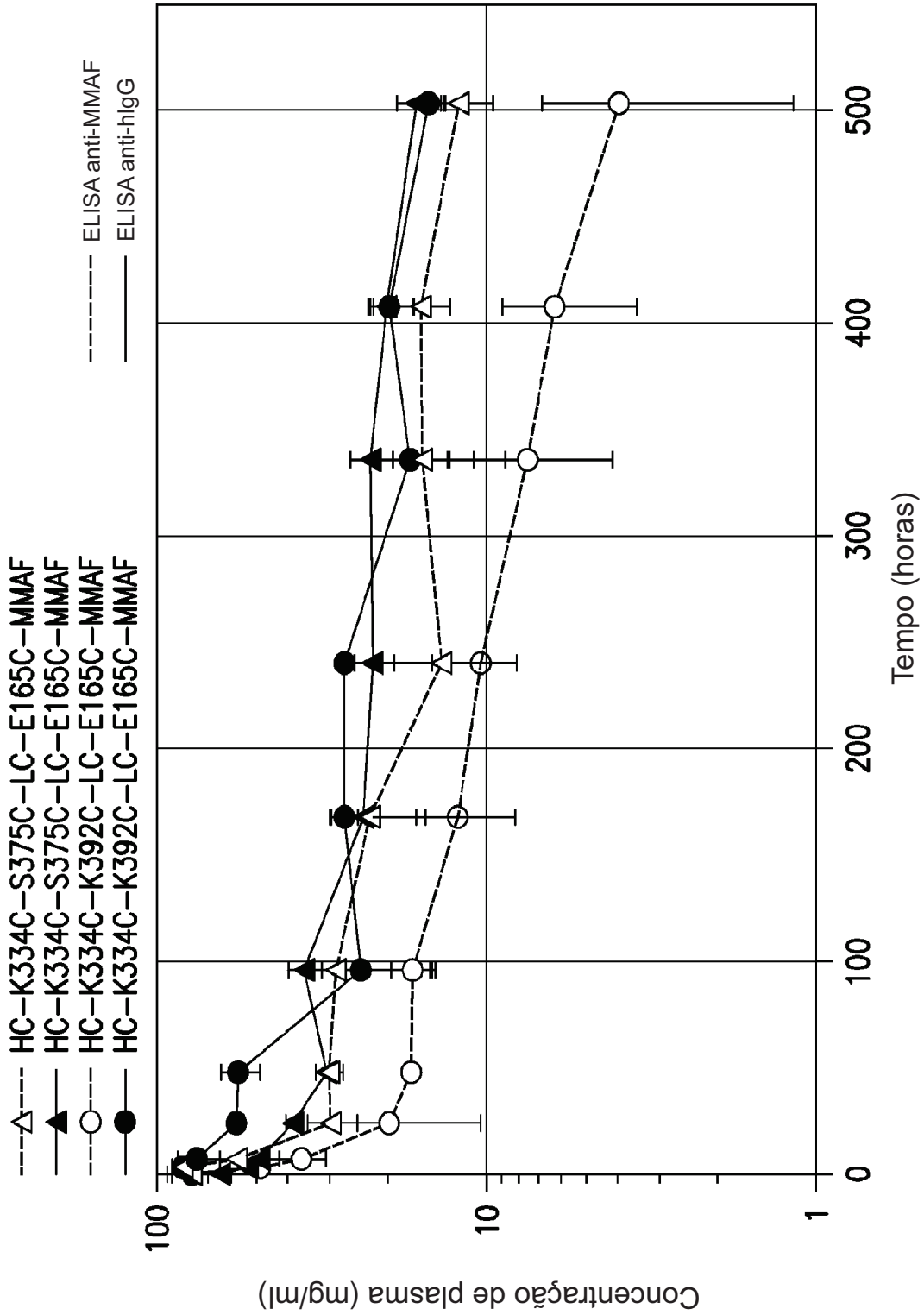


FIG. 25K

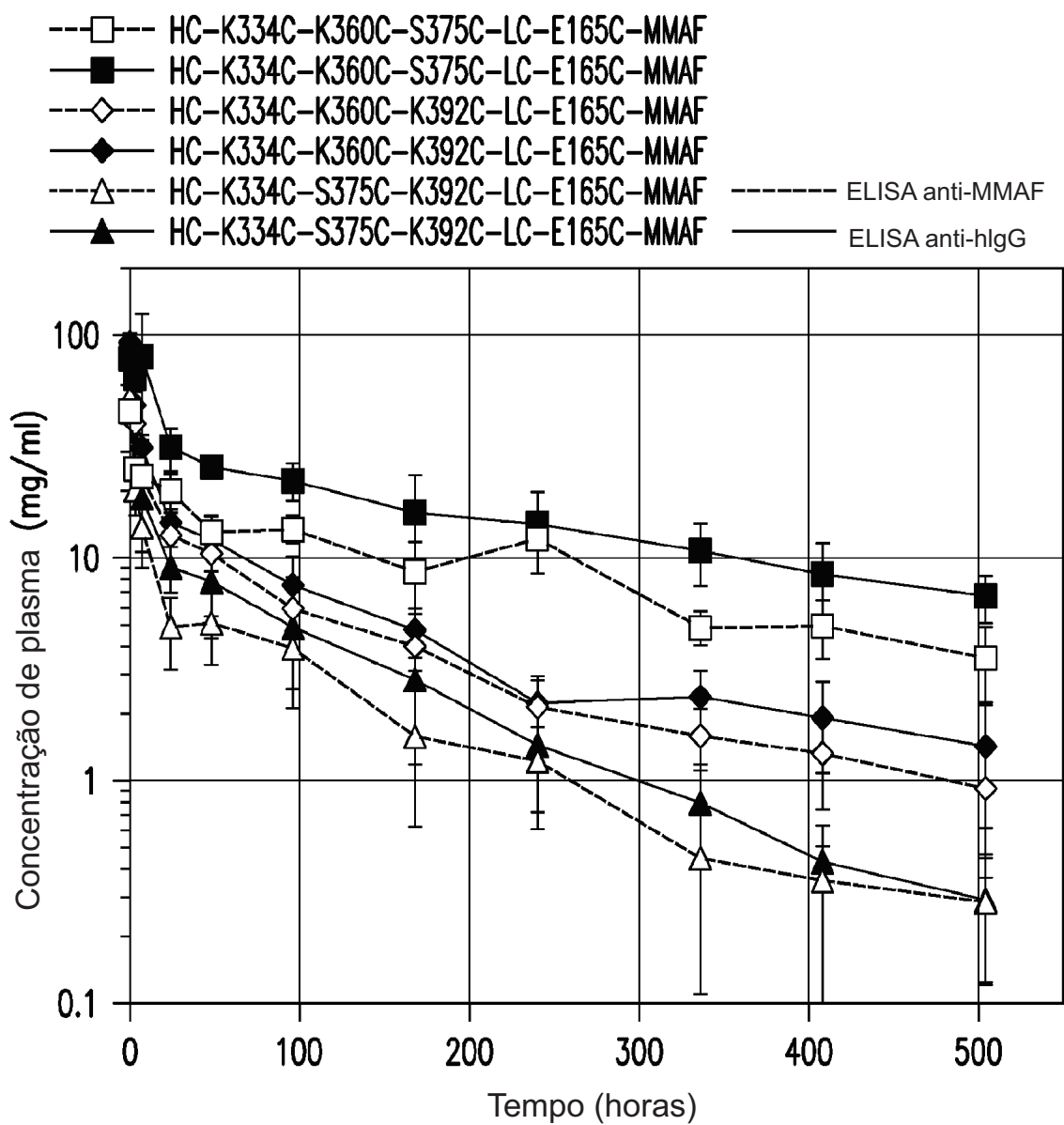


FIG.25L