

(11) Número de Publicação: **PT 1713830 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 16/30** (2007.10) **A61K 39/395** (2007.10)

**A61P 35/00** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.02.09**

(30) Prioridade(s): **2004.02.13 US 778915**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.10.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.07.22**  
**202/2009**

(73) Titular(es):

**MICROMET AG**

**STAFFELSEESTRASSE 2 81477 MÜNCHEN DE**

(72) Inventor(es):

**MALTE PETERS**

**DE**

**MATHIAS LOCHER**

**DE**

**NADJA PRANG**

**DE**

**CORNELIA QUADT**

**DE**

(74) Mandatário:

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

**PT**

(54) Epígrafe: **IMUNOGLOBULINAS ANTI-EPCAM**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO**"Imunoglobulinas anti-EpCAM"****A. Campo da invenção**

A presente invenção refere-se a métodos para tratar doenças tumorais utilizando moléculas de imunoglobulina. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos de tratamento envolvendo moléculas de imunoglobulina anti-EpCAM. A invenção refere-se também a utilizações destas imunoglobulinas na produção de medicamentos. A invenção refere-se também a moléculas de imunoglobulina que podem ser utilizadas para tratar doenças tumorais, bem como a composições que compreendem estas moléculas de imunoglobulina.

**B. Arte relacionada**

Ao conceber um regime terapêutico que envolve a administração de moléculas de imunoglobulina há vários factores que devem ser considerados. Por um lado, a imunoglobulina terapêutica deve ser administrada a um paciente numa quantidade suficiente para desencadear o efeito terapêutico desejado. Este efeito deve ocorrer aquando do tratamento inicial e deverá continuar a ocorrer durante um período de tempo tão grande quanto possível, uma vez que a imunoglobulina é progressivamente eliminada do corpo do paciente no tempo entre duas administrações consecutivas. Por outro lado, a quantidade de imunoglobulina administrada não deve ser tão elevada que provoque efeitos secundários adversos e/ou tóxicos no paciente.

Surge assim um problema quando a dose máxima de uma imunoglobulina que pode ser tolerada sem provocar efeitos secundários (dose máxima tolerada, ou "MTD") limita a quantidade de imunoglobulina para um nível de dose única que não é suficiente para manter, ao longo do tempo, o nível mínimo de imunoglobulina necessário para assegurar uma eficácia continuada. Neste cenário, torna-se impossível manter o "nível sérico mínimo" necessário para assegurar um efeito terapêutico continuado até à próxima administração de imunoglobulina. O "nível sérico mínimo" de um medicamento

refere-se geralmente à concentração mais baixa que o medicamento pode atingir em qualquer altura no corpo do paciente, sem perda de efeito terapêutico. Representa, assim, a quantidade mínima de medicamento que deve estar sempre presente no sangue do paciente, de forma a poder obter-se algum benefício terapêutico.

Existem várias abordagens para manter um nível sérico mínimo, desejado, de uma imunoglobulina terapêutica. Uma abordagem é aumentar a dose inicial da imunoglobulina no paciente.

No entanto, esta abordagem tem a desvantagem de o nível de imunoglobulina terapêutica que é seguro para o paciente ser provavelmente excedido, vindo o paciente provavelmente a sofrer efeitos secundários adversos e/ou tóxicos.

Outra abordagem é aumentar a frequência de administração da imunoglobulina terapêutica. No entanto, uma maior frequência de administração diminui bastante a qualidade de vida do paciente, uma vez que serão necessárias várias e frequentes visitas a uma clínica. Este é particularmente o caso quando a doença a tratar está ainda numa fase inicial e o paciente poderia, noutras circunstâncias, levar uma vida normal.

Adicionalmente, uma maior frequência de aplicação implica uma maior quantidade total de imunoglobulina terapêutica que é necessária para um regime terapêutico total. Deste modo, uma maior frequência de aplicação implica custos totais mais elevados associados com um determinado regime de terapia, em comparação com um regime de terapia em que a imunoglobulina terapêutica é administrada com menos frequência.

No caso da imunoglobulina terapêutica a administrar ser específica para um antigénio que está presente quer no tecido saudável, quer no doente, prevalecendo o antigénio mais no tecido doente em relação ao saudável, torna-se ainda mais crucial desenvolver um regime de tratamento que tome em consideração os pontos referidos acima. Deste modo, há um perigo considerável de dosagens demasiado elevadas ou demasiado frequentes poderem conduzir a uma interacção

indesejada entre a imunoglobulina terapêutica e o antígeno ao qual a imunoglobulina terapêutica se liga especificamente. Estas interações imunoglobulina-tecido saudável levam a efeitos secundários adversos e/ou tóxicos que podem complicar um regime de terapia que utiliza a imunoglobulina.

Um destes antígenos presente quer em tecido humano saudável, quer doente, é a molécula de adesão celular epitelial ("EpCAM", também designado por antígeno 17-1A, KSA, EGP40, GA733-2, ks 1-4 e esa). O EpCAM é uma glicoproteína de superfície expressa por células do epitélio simples e células tumorais derivadas deste. Embora a molécula de EpCAM seja apresentada na superfície de células de tecido saudável, a sua expressão é supra-regulada no tecido maligno. O EpCAM serve para aderir a células epiteliais de um modo orientado e altamente ordenado (Litvinov, J Cell Biol. 1997,139, 1337-1348). Dados de experiências anteriores com ratinhos e ratos transgênicos que expressam EpCAM humano nos seus epitélios sugerem que o EpCAM no tecido normal pode, no entanto, não estar acessível a anticorpos administrados de forma sistémica (McLaughlin, Cancer Immunol. Immunother., 1999,48, 303-311). Por transformação maligna de células epiteliais as células tumorais de crescimento rápido deixam de apresentar o elevado ordenamento celular dos epitélios.

Como consequência, a distribuição de EpCAM na superfície torna-se menos restrita e a molécula fica mais exposta nas células tumorais. Devido a terem a sua origem em células epiteliais, as células tumorais da maioria dos carcinomas ainda expressam EpCAM na sua superfície.

No passado, o EpCAM demonstrou ser um alvo compensador para o tratamento do cancro com imunoglobulinas monoclonais, em especial em pacientes com doença residual mínima que sofrem de células tumorais disseminadas que poderão mais tarde causar metástases sólidas e, desse modo, piorar o prognóstico do paciente. Em pacientes com cancro colorrectal residual mínimo, uma imunoglobulina monoclonal de murino específica para a molécula EpCAM diminuiu a taxa de mortalidade em cinco anos em 30%, em comparação com pacientes não tratados, quando aplicada sistemicamente em cinco doses, no espaço de quatro meses após cirurgia do tumor primário (Riethmuller, Lancet 343 (1994),

1177-83). Mais recentemente, foi referida a sobre-expressão forte de EpCAM em cerca de 40% dos pacientes com cancro da mama e esta está associada com uma baixa sobrevivência global e livre de doença (Spizzo et al., Int. J. Cancer 98 (2002), 883- 8). Mais recentemente, a expressão de EpCAM foi analisada em 3.722 pacientes. Verificou-se que a expressão de EpCAM é muito comum em tumores epiteliais, tendo esta expressão sido observada em mais de 88% das amostras de tumor. Especificamente, a expressão de EpCAM foi observada em 94,1% dos cancros do ovário, 94% dos cancros do cólon, 92,3% dos cancros do estômago, 90,1% dos cancros da próstata e 70,9% dos cancros do pulmão.

Um exemplo de um anticorpo monoclonal (murino) que reconhece o EpCAM é o Edrecolomab (Panorex) (Koprowski, Somatic Cell Genet. 1979,5, 957-971 e Herlyn, Cancer Res. , 1980,40, 717-721;). No entanto, a primeira administração de Panorex durante a imunoterapia adjuvante de cancro do cólon levou ao desenvolvimento e exacerbação de granulomatose de Wegener, sugerindo que o Panorex deve ser aplicado com cuidado num paciente com doença auto-imune (Franz, Onkologie 2000,23, 472-474;).

As limitações do Panorex são a formação rápida de anticorpos humanos anti-ratinho (HAMA), a capacidade limitada para interagir através do seu receptor IgG2a Fcy de murino com mecanismos imunitários efectores humanos e a curta semivida em circulação (Frodin, Cancer Res. , 1990,50, 4866-4871). Além disso, o anticorpo de murino provocou reacções alérgicas do tipo imediato e anafilaxia, por injeção repetida em pacientes (Riethmuller, Lancet 1994, 343,1177-1183, Riethmüller, J Clin Oncol., 1998,16, 1788-1794 e Mellstedt, Annals New York Academy of Sciences 2000,910, 254-261).

A ING-1 é outra imunoglobulina anti-EpCAM conhecida (Lewis, Curr. Op. Mol. Ther. 5,433- 6,2003). A ING-1 é uma imunoglobulina IgG1 quimérica, ratinho-humano, actualmente em estudos clínicos de fase I/II de pacientes com tumores epiteliais avançados.

Apesar de se verificar que uma dose de 1 mg/kg de imunoglobulina proporciona o maior efeito em ratinhos que

foram pré-injectados com células tumorais humanas, esta dose originou pancreatite em 2 de entre 2 pacientes humanos com adenocarcinomas (elevação de amilase e lipase com dor abdominal), impedindo o escalonamento posterior da dose. Verificou-se que a MTD para ING-1 era de apenas 0,3 mg/kg de peso corporal, aplicados intravenosamente, a cada 3 semanas. Considerando que a semivida de ING-1 nesta dosagem é de cerca de 31 horas e assumindo que um adulto médio pesa 75 kg e tem cerca de 4,25 litros de sangue, o nível sérico de ING-1 após 21 dias (i.e., após 16,25 semividas) teria diminuído abaixo de  $7 \times 10^{-5}$ , µg/mL sangue, mais de quatro ordens de grandeza do que o nível sérico de 1 µg/mL que se verificou ser necessário para obter efeitos citolíticos máximos. A MTD de ING-1 impede assim que o nível plasmático mínimo necessário para a imunoglobulina anti-EpCAM seja mantido.

Existe, deste modo, uma necessidade de um regime de tratamento que envolva anticorpos anti-EpCAM que possam ser utilizados para o tratamento do cancro. Deste modo, um objectivo da presente invenção é proporcionar um regime de tratamento envolvendo imunoglobulinas anti-EpCAM que ultrapasse os problemas descritos acima.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A necessidade acima referida é satisfeita utilizando uma imunoglobulina humana que se liga especificamente ao antigénio EpCAM humano, tendo a referida imunoglobulina uma semivida sérica de pelo menos 15 dias após administração a um paciente humano. A cadeia pesada compreende a sequência de SEQ ID NO:1, a cadeia leve a sequência de SEQ ID NO:2.

Podem-se obter alguns efeitos vantajosos utilizando uma imunoglobulina anti-EpCAM com uma semivida sérica de pelo menos 15 dias. De maior relevância, esta semivida relativamente longa implica que a imunoglobulina anti-EpCAM administrada como parte do método da invenção não será eliminada do sangue tão rápido quanto outra imunoglobulina com uma semivida mais curta, por exemplo a de ING-1, como discutido acima. Assumindo, assim, que uma imunoglobulina anti-EpCAM que preenche os requisitos da imunoglobulina a utilizar no método da invenção e uma imunoglobulina anti-EpCAM

que não preenche estes requisitos são ambas administradas a um humano em simultâneo e em quantidades absolutas idênticas, após um determinado tempo persistirá no soro mais da primeira imunoglobulina do que da última. Num sentido inverso, a maior persistência no soro permite que seja administrada menos imunoglobulina anti-EpCAM no método da invenção, num determinado espaço de tempo, do que seria possível para outra anti-EpCAM com uma semivida mais curta, mantendo ao mesmo tempo um determinado nível sérico mínimo predeterminado, i.e., assegurando ao mesmo tempo que a concentração sérica total de agente terapêutico nunca desce abaixo do nível mínimo determinado como necessário para obter uma eficácia continuada entre duas administrações consecutivas. Isto tem o efeito vantajoso de se poder administrar menos imunoglobulina anti-EpCAM do método da invenção, em qualquer dose particular, eliminado desse modo a possibilidade de, ou pelo menos mitigando quaisquer efeitos secundários adversos e/ou tóxicos.

A semivida relativamente longa da imunoglobulina anti-EpCAM, tal como utilizada no método da invenção, também implica que a administração não tem que ocorrer de forma tão frequente, aumentando assim a qualidade de vida do paciente e reduzindo o custo total da terapia.

O facto de a imunoglobulina anti-EpCAM utilizada no método da invenção ser uma imunoglobulina humana reduz, ou até elimina, a possibilidade de uma resposta imunitária indesejada, desenvolvida pelo sistema imunitário do paciente contra a imunoglobulina administrada. Deste modo, os problemas associados com os anticorpos humanos anti-ratinho ("HAMA") observados quando se utilizam muitas moléculas de imunoglobulina de murino, ou mesmo moléculas quiméricas murino-humano na terapia, não constituem um problema de acordo com o método da invenção.

Apesar de não estarem cingidos à teoria, os inventores acreditam que uma imunoglobulina anti-EpCAM, tal como utilizada neste aspecto da invenção, desencadeia um efeito terapêutico baseado em pelo menos um de dois mecanismos diferentes *in vivo*. Um mecanismo é conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos ("ADCC"). Na ADCC, uma célula ("célula alvo") que é revestida com

imunoglobulina é morta por uma célula ("célula efectora") com receptores Fc que reconhecem a porção Fc da imunoglobulina que reveste a célula alvo. Na maioria dos casos, as células efectoras que participam na ADCC são células assassinas naturais ("NK") que têm na sua superfície, ou o receptor Fc, Fc- $\gamma$ -RIII e/ou a molécula CD16. Deste modo, apenas as células revestidas com imunoglobulina são mortas, pelo que a especificidade da morte celular se correlaciona directamente com a especificidade de ligação - aqui a EpCAM- da imunoglobulina que reveste essas células.

Um outro mecanismo através do qual a imunoglobulina, utilizada como descrito na presente invenção, desencadeia um efeito terapêutico é conhecido como citotoxicidade dependente do complemento ("CDC"). Na CDC, duas imunoglobulinas idênticas ligam-se a dois antigénios idênticos (por exemplo, aqui EpCAM) na superfície de uma célula alvo, de modo que as suas porções Fc respectivas ficam próximas uma da outra. Este cenário atrai proteínas do complemento, entre estas proteínas do complemento clq e c3 e c9, sendo que esta última cria um poro na célula alvo. A célula alvo é morta por esta perfuração. Ao mesmo tempo, a(s) célula alvo também fica decorada noutros locais na sua superfície, num processo designado por opsonização. Esta decoração atrai células efectoras que matam então a(s) célula alvo de um modo análogo ao descrito acima no contexto do mecanismo ADCC.

Devido à semivida longa da imunoglobulina utilizada no método de acordo com este aspecto da invenção, o benefício de um ou ambos os mecanismos acima descritos pode ser explorado por mais tempo e a níveis mais elevados do que é possível utilizando uma imunoglobulina anti-EpCAM com uma semivida mais curta.

De acordo com este aspecto da invenção, a imunoglobulina anti-EpCAM é administrada a um paciente com uma frequência não superior a uma vez por semana, de preferência com uma frequência não superior a uma vez de duas em duas semanas. A este respeito, é explorada a semivida sérica vantajosamente longa da imunoglobulina anti-EpCAM. No caso de a administração ocorrer uma vez por semana, apenas será necessário administrar



pequenas quantidades de imunoglobulina em qualquer administração, uma vez que mais de metade da imunoglobulina previamente administrada irá permanecer no sangue do paciente.

Isto porque uma semana é menos do que a semivida de aproximadamente 15 dias da imunoglobulina previamente administrada.

No caso da administração ocorrer cerca de uma vez de duas em duas semanas, a frequência de dosagem de acordo com o método da invenção corresponde aproximadamente à semivida da imunoglobulina. Deste modo, o nível sérico desta imunoglobulina no intervalo entre duas administrações consecutivas nunca diminuirá mais do que cerca de metade da sua quantidade, imediatamente após a administração anterior respectiva. Isto significa que a dosagem de qualquer administração particular não necessita ser maior do que a quantidade necessária para originar, imediatamente após a administração, aproximadamente duas vezes o nível sérico mínimo predeterminado, alcançado na altura da administração seguinte.

Em geral, podem-se definir duas fases de administração: Uma primeira "fase de carga", em que uma ou mais doses de carga são administradas de modo a se atingir um determinado nível plasmático estacionário de imunoglobulina e uma "fase de manutenção", em que se administram doses múltiplas de modo a manter o nível plasmático de imunoglobulina desejado. A dose de carga é tipicamente administrada numa quantidade maior e/ou numa sucessão mais frequente do que as últimas doses de manutenção, mantendo assim a duração da fase de carga num mínimo.

De acordo com os regimes de dosagem actuais que não correspondem ao presente aspecto da invenção, o médico tem duas opções: ou a imunoglobulina anti-EpCAM é administrada numa quantidade inicial suficientemente elevada para assegurar, após a sua rápida eliminação do corpo, que o nível sérico mínimo é mantido antes da próxima administração (caso em que a dose inicial elevada irá provavelmente causar efeitos secundários adversos e/ou tóxicos, tais como pancreatite); ou a imunoglobulina anti-EpCAM é administrada numa quantidade

inicial suficientemente baixa para evitar efeitos secundários adversos e/ou tóxicos (caso em que o nível sérico da imunoglobulina anti-EpCAM desce abaixo do nível sérico mínimo antes da próxima administração, levando a uma perda de efeito terapêutico). O compromisso é aumentar a frequência de administração da dosagem baixa, levando a uma perda significativa da qualidade de vida do paciente.

Pelo contrário, o método de acordo com este aspecto da invenção estabelece um equilíbrio em que, por um lado, se podem administrar doses individuais em quantidades que não levam a efeitos secundários adversos e/ou tóxicos e, por outro lado, a quantidade de imunoglobulina terapêutica no soro não desce abaixo do nível sérico mínimo necessário para um efeito terapêutico continuado entre administrações consecutivas. O ritmo de pelo menos cerca de uma semana entre duas administrações consecutivas, de preferência pelo menos cerca de duas semanas entre duas administrações consecutivas permite este equilíbrio, não diminuindo ao mesmo tempo a qualidade de vida do paciente.

De acordo com uma concretização da invenção, o nível sérico do anticorpo anti-EpCAM ainda presente de uma administração anterior é verificado no sangue, antes de efectuar a administração seguinte. Deste modo, o médico pode evitar readministrar a imunoglobulina anti-EpCAM demasiado cedo, como seria o caso, por exemplo, se ainda existisse bastante imunoglobulina anti-EpCAM no sangue do paciente, da administração anterior. Uma sobredosagem accidental, que pode levar a efeitos secundários adversos e/ou tóxicos, é assim evitada para um anticorpo anti-EpCAM para o qual a semivida exacta não seja ainda conhecida. Ao mesmo tempo, o médico ganha um maior conhecimento sobre a taxa de eliminação da imunoglobulina anti-EpCAM utilizada a partir desta medição intercalar, que em qualquer caso ocorre pelo menos duas semanas após uma administração prévia respectiva. Este conhecimento pode ser importante para ajustar de um modo mais fino o esquema de administração subsequente.

Este ajuste fino pode significar, com vantagem, esperar significativamente mais do que uma semana, ou de preferência mais tempo do que cerca de duas semanas entre administrações

consecutivas, aumentando assim ainda mais a qualidade de vida do paciente.

Com vantagem, esta verificação intercalar do nível sérico da imunoglobulina anti-EpCAM no sangue do paciente pode ser realizada do seguinte modo. Primeiro, o médico pode determinar, após um período de pelo menos uma semana após a última administração respectiva da referida imunoglobulina, mas antes da próxima administração respectiva da referida imunoglobulina, o nível sérico da referida imunoglobulina ainda presente no sangue do referido paciente, obtendo assim um valor intermédio do nível sérico para a referida imunoglobulina. Este valor intermédio do nível sérico para a referida imunoglobulina é então comparado com um valor de nível sérico mínimo predeterminado para a referida imunoglobulina. Se o valor intermédio do nível sérico para a referida imunoglobulina é bem acima do nível sérico mínimo predeterminado para a referida imunoglobulina, então o médico pode decidir, com vantagem, esperar ainda mais tempo para que o nível sérico da imunoglobulina anti-EpCAM decresça ainda mais. Nesta altura, os passos acima referidos podem ser repetidos de modo a obter um novo nível sérico intermédio da referida imunoglobulina que terá então diminuído para um valor mais próximo do nível sérico mínimo predeterminado. Em qualquer caso, não se deve esperar demasiado para que o nível sérico intermédio determinado para a imunoglobulina desça abaixo do nível sérico mínimo predeterminado para essa imunoglobulina. Quando o médico estabelece, possivelmente por ciclos de espera repetidos, determinando o nível sérico intermédio e comparando este nível sérico intermédio com o nível sérico mínimo predeterminado para uma imunoglobulina anti-EpCAM particular, que o nível sérico intermédio desta imunoglobulina diminuiu para uma determinada percentagem do referido nível sérico mínimo, a administração seguinte respectiva da imunoglobulina anti-EpCAM pode ser efectuada de forma a trazer o nível sérico da imunoglobulina anti-EpCAM de novo para um nível adequado para o próximo ciclo de eliminação. Com vantagem, esta determinada percentagem pode corresponder a um nível sérico que é entre 15%, de preferência entre 10%, muito preferencialmente entre 5% do nível sérico mínimo predeterminado para a imunoglobulina anti-EpCAM particular, utilizada.

Com vantagem, o nível sérico intermédio de imunoglobulina pode ser medido por qualquer método conhecido de um perito na arte, por exemplo por imunoensaio. Por exemplo, pode-se utilizar um ensaio de imunofluorescência, um radioimunoensaio ou um ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas-ELISA para este fim, sendo preferido o último.

Numa concretização preferida deste aspecto da invenção, a imunoglobulina anti-EpCAM humana é administrada com uma frequência não superior a uma vez de duas em duas semanas. Numa concretização especialmente preferida, a administração ocorre em intervalos de duas semanas, em que cada dose subsequente é equivalente em quantidade à primeira dose administrada, i.e., todas as doses são feitas na mesma quantidade. A administração deste modo é suficiente para manter um nível sérico de imunoglobulina que nunca decai abaixo do nível sérico mínimo predeterminado, necessário para um efeito terapêutico benéfico desta imunoglobulina, evitando ao mesmo tempo, ou evitando em grande medida, efeitos secundários adversos e/ou tóxicos.

No entanto, noutra concretização, também se preconizam frequências de administração de mais do que, ou muito mais do que duas semanas. No caso de a imunoglobulina ser administrada em intervalos de tempo maiores do que duas semanas, a quantidade de anticorpo administrada em qualquer altura, subsequentemente à dose inicial, deverá ser maior do que uma dose inicial administrada na expectativa de uma administração subsequente em duas semanas. A quantidade em que esta dose subsequente administrada após mais do que duas semanas pode ser maior do que uma dose administrada após duas semanas, pode ser determinada numa base caso a caso, por exemplo, por meio de simulações farmacocinéticas (e.g., com WinNonlin 4.0.1 (Pharsight Corporation, EUA; 2001) tais como as descritas nos exemplos da presente descrição. Um perito na arte conhece o modo de construir e/ou aplicar estas simulações. Estas simulações são vantajosamente construídas de modo a que, após uma administração respectiva, o nível de imunoglobulina anti-EpCAM no soro do paciente não decai abaixo do nível sérico mínimo determinado como necessário para uma eficácia terapêutica.

A semivida sérica longa da imunoglobulina anti-EpCAM humana assegura que ao longo deste período longo entre administrações, por exemplo três ou mesmo quatro semanas, ou qualquer período intermédio de 2 a 5 semanas, o nível sérico mínimo predeterminado necessário para eficácia terapêutica é mantido.

Por outras palavras, a semivida longa da imunoglobulina anti-EpCAM humana (*i.e.*, cerca de 15 dias) assegura que uma quantidade significativa desta imunoglobulina ainda estará ainda presente no soro, de uma administração prévia, respectiva. Como resultado, será necessário administrar menos imunoglobulina anti-EpCAM humana com a semivida de cerca de 15 dias, do que seria necessário para um anticorpo sem esta semivida sérica longa. Isto reduz o risco de efeitos secundários adversos e/ou tóxicos.

Deve referir-se que estes esquemas de administração prolongados e as múltiplas vantagens associadas com os mesmos (ver acima) seriam impossíveis com uma imunoglobulina anti-EpCAM que tenha uma semivida curta, mantendo ao mesmo tempo um efeito terapêutico (por exemplo com a imunoglobulina anti-EpCAM ING-1, para a qual foi medida uma semivida sérica em humanos entre 17 a 31 horas). Para assegurar que pelo menos a quantidade predeterminada de nível sérico mínimo desta imunoglobulina anti-EpCAM permanece no soro até à administração seguinte, seria necessário administrar tanta imunoglobulina anti-EpCAM que provavelmente haveria efeitos secundários adversos e/ou tóxicos. Por outro lado, evitando estes efeitos secundários adversos e/ou tóxicos por administração de uma quantidade inferior desta imunoglobulina anti-EpCAM levaria a uma perda de efeito terapêutico em algum ponto entre as duas administrações, em que a quantidade de imunoglobulina que persiste no sangue decai abaixo do nível sérico mínimo.

Obviamente, se determinado clinicamente necessário ou vantajoso, pode-se administrar, noutra concretização, uma imunoglobulina anti-EpCAM humana com uma semivida de cerca de 15 dias em intervalos de tempo inferiores a duas semanas, por exemplo em intervalos de 1 semana ou qualquer período intermédio de 1 semana a 2 semanas. Apesar de um cenário deste

tipo não explorar totalmente a semivida longa de cerca de 15 dias, há, no entanto, situações clínicas em que esta administração pode ser desejável. De forma a evitar uma acumulação indesejada da imunoglobulina anti-EpCAM humana no paciente, ao longo do tempo, é preferível reduzir a quantidade de anti-EpCAM humana administrada nestes intervalos mais curtos, em relação à quantidade que seria necessário administrar num ritmo de administração bissemanal. A quantidade em que esta dose subsequente administrada após menos de duas semanas deve ser inferior a uma dose administrada após duas semanas, pode ser determinada numa base caso a caso, por exemplo, por meio de simulações farmacocinéticas, tais como as descritas nos exemplos anexos da presente descrição. Um perito na arte conhece a forma de construir e/ou aplicar estas simulações. Estas simulações são construídas, com vantagem, de modo a que, após uma administração respectiva, não seja permitido que o nível de imunoglobulina anti-EpCAM no soro do paciente desça abaixo do nível sérico mínimo determinado como necessário para uma eficácia terapêutica.

De acordo com uma concretização, a administração pode ser intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. Alternativamente, pode-se utilizar um destes métodos de administração, como adequado. Também se preconizam protocolos de co-administração com outros compostos, e.g., construções de anticorpo biespecíficas, toxinas dirigidas para alvos ou outros compostos, que actuam via células T ou outros compostos, tais como agentes antineoplásicos que actuam por outros mecanismos. O regime clínico para co-administração da imunoglobulina anti-EpCAM pode incluir a co-administração ao mesmo tempo, antes ou depois da administração do outro componente.

Com vantagem, a doença tumoral é seleccionada de entre cancro da mama, cancro epitelial, carcinoma hepatocelular, cancro colangiocelular, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro da próstata, cancro da cabeça e pescoço, cancro da pele (melanoma), um cancro do tracto urogenital, e.g., cancro dos ovários, cancro endometrial, cancro cervical, e cancro do rim; cancro do pulmão, cancro gástrico, um cancro do intestino delgado, cancro do fígado, cancro do pâncreas, cancro da

bexiga, cancro do ducto biliar, cancro do esófago, cancro das glândulas salivares ou um cancro da glândula tiróide.

Noutra concretização, a doença também pode ser uma doença residual mínima, de preferência um tumor sólido precoce, tumor sólido avançado, ou tumor sólido metastático que se caracteriza por recorrência local e não local do tumor, causada pela sobrevivência de células individuais.

Numa concretização especialmente preferida deste aspecto da invenção, a doença tumoral é cancro da próstata ou cancro da mama. A imunoglobulina anti-EpCAM humana administrada é uma que compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina com uma sequência de aminoácido como descrito na SEQ ID NO:1 e uma cadeia leve de imunoglobulina com uma sequência de aminoácido como descrito na SEQ ID NO: 2. Quando se administra uma destas imunoglobulinas anti-EpCAM humanas, é preferido que esta seja administrada numa quantidade de dosagem respectiva de 1-7 mg/kg de peso corporal, ainda mais preferencialmente 2-6 mg/kg de peso corporal, cerca de uma vez de duas em duas semanas.

Outro aspecto da invenção proporciona a utilização de uma imunoglobulina humana que se liga especificamente ao antigénio EpCAM humano, sendo que a referida imunoglobulina exhibe uma semivida sérica de pelo menos 15 dias e está descrita na reivindicação 1, para a preparação de um medicamento para tratar doenças tumorais. Alternativamente, pode-se utilizar uma composição que compreende uma imunoglobulina deste tipo para preparar o medicamento acima.

O medicamento pode então ser administrado, com vantagem, de acordo com o esquema de dosagem descrito acima para o método de tratamento de uma doença tumoral.

De acordo com uma concretização deste aspecto da invenção, o medicamento preparado é adequado para administração por via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. Alternativamente, a administração pode ocorrer por uma combinação de mais do que uma destas vias, conforme adequado. Também se preconizam protocolos de co-administração com outros

compostos, e.g., construções de anticorpos biespecíficos, toxinas direccionadas para alvos, ou outros compostos que actuam através de células T ou outros compostos, tais como agentes antineoplásicos que actuam através de outros mecanismos. O regime clínico para co-administração da imunoglobulina anti-EpCAM pode incluir a co-administração ao mesmo tempo, antes ou depois da administração do outro componente.

Com vantagem, a doença tumoral é cancro da mama, cancro epitelial, cancro hepatocelular, carcinoma, cancro colangiocelular, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro da próstata, cancro da cabeça e pescoço, cancro da pele (melanoma), cancro do tracto urogenital e.g., cancro dos ovários, cancro do endométrio, cancro cervical e cancro do rim; cancro do pulmão, cancro gástrico, um cancro do intestino delgado, cancro do fígado, cancro do pâncreas, cancro da bexiga, cancro do ducto biliar, cancro do esófago, cancro das glândulas salivares ou um cancro da glândula tiróide.

Noutra concretização, a doença também pode ser uma doença residual mínima, de preferência um tumor sólido precoce, tumor sólido avançado ou tumor sólido metastático, que se caracteriza por recorrência local e não local do tumor, causada por sobrevivência de células individuais.

Noutro aspecto, a invenção refere-se a uma imunoglobulina humana que se liga especificamente ao antigénio EpCAM, caracterizada por a referida imunoglobulina exibir uma semivida sérica de pelo menos 15 dias, após administração a um paciente humano. As vantagens associadas com uma semivida sérica longa foram enumeradas acima, no âmbito da utilização de um anticorpo deste tipo num método de tratamento para doenças tumorais. É preferido que a imunoglobulina exiba uma semivida sérica de 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias ou 15 dias. É especialmente preferida uma semivida sérica de cerca de 15 dias.

De acordo com a invenção, a semivida da imunoglobulina humana é de 15 dias e a imunoglobulina humana compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina com uma sequência de aminoácidos como descrito na SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve de



imunoglobulina com uma sequência de aminoácidos como descrito na SEQ ID NO: 2.

Outro aspecto da invenção proporciona uma composição que compreende uma imunoglobulina anti-EpCAM humana como descrito acima. Esta composição pode ser administrada, com vantagem, a um paciente humano, como parte de um regime de terapia para tratar uma doença. Tendo em conta a prevalência da expressão da molécula EpCAM em doenças tumorais, é especialmente preferido que esta composição possa ser administrada como parte de um regime terapêutico destinado a tratar esta doença tumoral. As doenças tumorais que podem ser tratadas, com vantagem, por administração desta composição de acordo com este aspecto da invenção incluem cancro da mama, cancro epitelial, carcinoma hepatocelular, cancro colangiocelular, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro da próstata, cancro da cabeça e pescoço, cancro da pele (melanoma), um cancro do tracto urogenital, e.g., cancro dos ovários, cancro endometrial, cancro cervical e cancro dos rins; cancro do pulmão, cancro gástrico, um cancro do intestino delgado, cancro do fígado, cancro do pâncreas, cancro da bexiga, um cancro do ducto biliar, cancro do esófago, cancro das glândulas salivares ou um cancro da glândula tiróide.

Noutra concretização, a doença também pode ser uma doença residual mínima, de preferência um tumor sólido precoce, tumor sólido avançado, ou tumor sólido metastático, que se caracteriza por recorrência local e não local do tumor, causada por sobrevivência de células individuais.

Está no âmbito deste aspecto da invenção que estas doenças tumorais possam ser tratadas quer isoladas, quer em combinação, tendo a combinação destas doenças resultado, por exemplo, da propagação metastática de uma doença tumoral primária que leva a uma doença tumoral secundária, múltipla.

Tal como aqui utilizados, os termos "anticorpo", "molécula de anticorpo", "ing" e "molécula ing" devem ser entendidos como equivalentes. Quando adequado, qualquer utilização do plural implica o singular e qualquer utilização do singular implica o plural.

## DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS FIGURAS

As figuras seguintes fazem parte do presente pedido e são incluídas para demonstrar melhor alguns aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor entendida com referência a uma ou mais destas figuras, em combinação com a descrição detalhada de concretizações específicas aqui apresentadas.

FIGURA 1. Esquemas de dosagem para coortes de fase I

FIGURA 2. Concentração plasmática de imunoglobulina anti-EpCAM *versus* tempo, por coorte

FIGURA 3. Parâmetros farmacocinéticos de coortes de pacientes após uma única dose de imunoglobulina anti-EpCAM

FIGURA 4. Parâmetros farmacocinéticos de coortes de pacientes após doses múltiplas de imunoglobulinas anti-EpCAM

FIGURA 5. Representação esquemática de um modelo de três compartimentos

FIGURA 6. Os níveis plasmáticos de pico e mínimo de imunoglobulina anti-EpCAM com um nível mínimo alvo de 30 µg/mL

FIGURA 7. Níveis plasmáticos de pico e mínimo de imunoglobulina anti-EpCAM com um nível mínimo alvo de 10 µg/mL

FIGURAS 8A-F. Coloração imuno-histológica de tecidos que expressam EpCAM

FIGURA 9. Valores medianos de pontuações histológicas semi-quantitativas de EpCAM em pacientes com várias doenças de fígado.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Exemplo 1: Aquisição de dados farmacocinéticos medidos no estudo de fase I.

**Coortes.** As farmacocinéticas de uma imunoglobulina anti-EpCAM caracterizada por SEQ ID NO:1 e 2 (daqui para a frente "Anti-EpCAM") foram investigadas em pacientes com cancro da próstata refractária a hormonas, após duas infusões intravenosas individuais, a um intervalo de tempo de 14 dias.

As dosagens administradas eram de 10, 20, 40, 64, 102, 164 e 262 mg/m<sup>2</sup> de área de superfície corporal. Dois ou três pacientes em cada nível de dosagem foram tratados no dia 1 e dia 15. Recolheram-se amostras de sangue a 29-31 pontos de tempo de amostragem, desde o dia 1 até ao dia 70 (56 dias após a segunda administração). As concentrações séricas de Anti-EpCAM foram medidas por um método ELISA específico. O ELISA foi realizado como um ELISA sanduíche típico, tendo-se utilizado um anticorpo de rato anti-Anti-EpCAM como anticorpo de captura e um anticorpo de galinha anti-Anti-EpCAM como anticorpo de detecção (como descrito em Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Os esquemas de dosagem utilizados para as coortes de pacientes de fase I são apresentados na FIGURA 1. O símbolo "~" na coluna 3 da FIGURA 1 denota que os valores calculados para as doses, que têm as unidades mg/kg, são o resultado de doses médias (calculadas em relação ao número de pacientes na coorte respectiva) divididas pelo peso corporal médio (também calculado em relação ao número de pacientes na coorte respectiva). Deste modo, um valor de dosagem respectiva representa o quociente de dois valores médios.

**Concentrações séricas.** Os níveis séricos de Anti-EpCAM (valores médios  $\pm$  DP de 2-3 determinações) foram medidos nos pacientes individuais após duas infusões intravenosas individuais de Anti-EpCAM. Uma comparação dos perfis individuais nas coortes individuais está representada na FIGURA 2. Os perfis de concentração média/tempo (médias aritméticas) obtidos para todos os grupos de doses, de pacientes com cancro da próstata refractário a hormonas após duas infusões intravenosas simples a um intervalo de tempo de 14 dias são apresentados na FIGURA 2.

**Esquema de dosagem simplificado.** Os pacientes receberam uma dosagem personalizada que foi calculada em mg de Anti-EpCAM/m<sup>2</sup> de área de superfície corporal. Devido à consistência dos perfis séricos observados para os diferentes pacientes num grupo de dose, analisou-se se seria possível uma simplificação do esquema de dosagem. Para este fim, os perfis das coortes 5, 6 e 7 foram normalizados para uma dose total igual de 500 mg e os resultados foram comparados em relação à variabilidade dos níveis séricos.

Para os 9 pacientes, uma normalização da dose para uma dose total de 500 mg originou níveis séricos que variam por um coeficiente médio (% CV) de 26,6%. O coeficiente de variação variou entre 14,8 a 67,3%, sendo a variação mais elevada observada a níveis séricos mais baixos. Com base nestes resultados, considerou-se possível uma simplificação do regime de dose para uma dose total.

**Farmacocinéticas: Avaliação não compartimental.** Na Figura 3 apresenta-se um sumário dos principais parâmetros farmacocinéticos (médias aritméticas) calculados para pacientes de todas as sete coortes com cancro de próstata refractário a hormonas, após a primeira infusão intravenosa (dose única) de Anti-EpCAM. Na figura 4 apresentam-se os principais parâmetros farmacocinéticos (médias aritméticas) de Anti-EpCAM após a segunda administração intravenosa (dose múltipla) no dia 14.

As definições dos termos utilizados nas Figuras 3 e 4 são como se segue.  $C_{\max}$  refere-se à concentração máxima (medida).  $AUC_T$  refere-se à área sob a curva de concentração/tempo (AUC) observada num intervalo de dose ( $T = 14$  dias) calculado com a regra trapezoidal de 14 a 28 dias (para dose múltipla).  $AUC_{\text{INF}}$  refere-se à AUC calculada utilizando a regra trapezoidal de 0 horas até infinito, de acordo com a fórmula  $AUC^{\infty} = AUC_z + C_z/ke$ .  $t^{1/2}$  refere-se à semivida terminal aparente ( $\ln 2/\lambda_z$ ), em que o termo "médio" se refere à média de valores múltiplos determinados para a semivida sérica; o termo "aparente" refere-se à extrapolação de um ajuste de uma curva a valores farmacocinéticos seleccionados a um ponto de tempo infinito, de modo que a quantidade de imunoglobulina presente no soro de um paciente no tempo infinito decai assintoticamente para zero; e o termo "terminal" refere-se a este ponto de tempo infinito. O parâmetro  $T$  é um parâmetro farmacocinético convencional utilizado como factor de multiplicação constante e o parâmetro  $z$  denota qualquer ponto de tempo  $z$ .  $Cl_{ss}$  refere-se à eliminação corporal total, calculada de acordo com a fórmula  $Dose/AUC$ .  $V_{ss}$  refere-se ao volume de distribuição aparente.  $V_z$  refere-se ao volume de distribuição médio.  $CL$  refere-se ao volume de eliminação médio.

A semivida terminal aparente média ( $t^{1/2}$ ) foi determinada como sendo de  $6,72 \pm 0,88$  dias após uma dose única (calculada a partir de 7-14 dias) e  $14,74 \pm 4,23$  dias após administração de doses múltiplas (calculadas a partir dos três últimos pontos de amostragem, *i.e.*, 28-42 dias ou 35-70 dias). Os valores de semivida diferentes são devido ao período de observação claramente mais longo após a segunda dose, tornando-se os valores de semivida medidos tanto mais precisos quanto por mais tempo os valores são medidos, como resultado de um melhor ajuste à curva.

Deste modo, o valor para  $t^{1/2}$  de  $14,74 \pm 4,23$  dias representa o valor mais preciso para  $t^{1/2}$ , uma vez que este foi medido durante um período de tempo longo.

Após a primeira administração determinou-se um  $V_z$  de 10,4 L e um volume de eliminação médio de 1,1 L/dia. Estes dados estão em concordância com os resultados calculados para a segunda dose, com um  $V_z$  médio de 11,5 L e um volume de eliminação médio (CL) de 1,0 L/dia. Além disso, estes dados são comparáveis entre todos os grupos de doses (coeficiente de variação de 8,2 a 14,8%). Como resultado, não se observou uma dependência da dose, nem para o parâmetro  $V_z$ , nem para o parâmetro CL.

**Linearidade da Dose.** A relação entre a dose e os parâmetros  $C_{max}$ ,  $AUC_{último(0-14)}/AUC_T(14-28)$  e  $AUC_{inf}$  foi determinada. Para todos os parâmetros ( $C_{max}$ ,  $AUC_{último(0-14)}/AUC_T(14-28)$  e  $AUC_{inf}$ ) pode-se assumir um aumento linear com a dose, na gama de doses analisadas.

#### **Farmacocinética: avaliação compartimental**

A análise compartimental baseou-se em dois modelos diferentes que necessitam de uma infusão constante do fármaco. Para determinar o melhor modelo compartimental, seleccionaram-se os dados obtidos a partir da coorte 6, referentes à concentração média *versus* tempo. Para ambas as avaliações, o perfil após a segunda dose foi aplicado devido a uma maior tempo de observação após a administração.

De modo a investigar o melhor ajuste, utilizaram-se os seguintes modelos compartimentais:

Avaliação de 2 Compartimentos

Avaliação de 3 Compartimentos

Com ambos os modelos foi possível uma avaliação, no entanto, obteve-se um ajuste claramente melhor com a análise de 3 compartimentos. A congruência entre  $Y$  observado e  $Y$  previsto era notavelmente melhor após a análise de 3 compartimentos. Por este motivo, todas as outras avaliações foram realizadas com base neste modelo de 3 compartimentos.

As farmacocinéticas de Anti-EpCAM foram investigadas em pacientes após uma infusão intravenosa de curto prazo de 10, 20, 40, 102, 164 e 262 mg/m<sup>2</sup> de área de superfície corporal. Trataram-se dois ou três pacientes por coorte. Recolheram-se amostras de sangue durante um período de tempo de 42 ou 70 dias. As concentrações séricas de Anti-EpCAM foram medidas por um método ELISA. Foi possível obter e avaliar para todos os pacientes, perfis séricos completos de até 42 ou 70 dias.

O volume de eliminação e volume de distribuição não apresentaram dependência da dose e nenhuma diferença relevante após a primeira e a segunda doses. Com base nos dados de 7 coortes, pode-se assumir uma linearidade da dose para os parâmetros  $C_{\max}$ ,  $AUC_T$ ,  $AUC_{\text{último}}$  e  $AUC_{\text{inf}}$  na gama de dosagens investigadas.

A análise compartimental mostrou um declínio de terceira ordem das concentrações séricas de Anti-EpCAM, com semividas de 0,565 dias ( $t_{1/2\alpha}$ ), 3,78 ( $t_{1/2\beta}$ ) e 13,3 dias ( $t_{1/2\lambda_z}$ ).

Como esperado a partir da semivida terminal (aproximadamente duas semanas), as simulações de vários regimes de dose produziram os melhores resultados para um esquema bissemanal. A simulação de uma dose semanal levou a uma acumulação, enquanto que a administração a cada 4 semanas resultou numa diminuição dos níveis séricos de Anti-EpCAM. Tendo em vista alcançar o alvo através de níveis tão rápido quanto possível, recomenda-se uma dose de carga com o dobro da quantidade, em comparação com a dose de manutenção.

**Exemplo 2: Modelação da estratégia de doseamento de Anti-EpCAM baseada em dados medidos, obtidos no estudo de fase I**

O regime de dosagem e duração do tratamento seleccionados para este estudo baseiam-se na modelação farmacocinética dos resultados do estudo clínico de fase I/II com Anti-EpCAM, em pacientes com cancro da próstata. O objectivo das simulações era encontrar um esquema de doseamento para Anti-EpCAM para se obterem níveis séricos mínimos de 10 e 30 µg/mL, respectivamente.

Com base em experiências pré-clínicas, é esperado que níveis séricos mínimos de 10 µg/mL sejam eficazes para actividade antitumoral de Anti-EpCAM. No entanto, não se pode pôr de parte a hipótese de doses mais elevadas poderem ser mais eficazes. Deste modo, uma segunda dose, calculada para se obter um nível sérico mínimo de 30 µg/mL, deve ser avaliada em ensaios clínicos. Não é esperada nenhuma toxicidade adicional com esta concentração sérica mínima uma vez que os valores C<sub>max</sub> e AUC não excedem os observados em estudos clínicos de fase I.

Devido ao melhor ajuste, todas as simulações se basearam em dados de avaliação de 3 compartimentos das coortes 5 a 7.

O objectivo das simulações era determinar o esquema de administração óptimo e a dose necessária, tendo em conta a frequência (semanal, bissemanal, a cada 4 semanas), diferentes níveis mínimos (10 µg/mL, 30 µg/mL Anti-EpCAM) e avaliar o benefício de uma dose de carga de Anti-EpCAM.

Como é esperado a partir do valor de semivida terminal de cerca de duas semanas, o regime de dosagem bissemanal levou aos melhores resultados. Aplicando uma frequência de administração de 7 dias e 28 dias, a simulação resultou numa acumulação ou numa ligeira diminuição dos níveis séricos, respectivamente. A aplicação de uma dose de carga (LD) permitiu atingir de imediato os níveis mínimos necessários. As doses seguintes e níveis séricos mínimo e máximo correspondentes foram simulados para administração intravenosa de Anti-EpCAM.

**Administração a cada 14 dias.** Como esperado a partir da semivida terminal de Anti-EpCAM, a administração bissemanal resultou em perfis simulados com valores  $C_{\min}$  e  $C_{\max}$  constantes e portanto podem ser vistos como o regime de dosagem recomendado. Deste modo, o modelo bissemanal foi escolhido para cálculo das doses necessárias para atingir níveis mínimos alvo de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de Anti-EpCAM.

Os parâmetros iniciais para os cálculos foram obtidos por avaliação compartimental.

Dados de estudo: medições farmacocinéticas obtidas no estudo de fase I/II do cancro da próstata.

*Software:* WinNonlin 4.0. 1 (Pharsight Corporation, EUA; 2001)

*Modelo:* PK Modelo 19 (infusão IV de 3 compartimentos, macro-constantes, sem tempo de espera, eliminação de 1ª ordem, ponderação uniforme).

A FIGURA 5 é uma representação esquemática do modelo de três compartimentos, em que '1' representa o compartimento central e '2' e '3' representam dois compartimentos periféricos diferentes. O compartimento central está em equilíbrio imediato com o plasma. O compartimento periférico requer algum tempo para atingir um equilíbrio com o compartimento central após uma administração de um fármaco.  $K_{13}$ ,  $K_{31}$ ,  $K_{12}$ ,  $K_{21}$ ,  $K_{10}$  são as constantes de velocidade respectivas, em que a ordem dos numerais 13, 31, etc. denota a direcção de passagem do Anti-EpCAM.

As simulações foram alargadas para um período de 120 dias, embora os dados do estudo original fossem limitados a um período de 70 dias. As simulações basearam-se numa fase de carga (*i.e.* , administração de um fármaco nos dias 1,8, e 15) e uma fase de manutenção (*i.e.* , administração do fármaco nos dias 29 e a cada 14 dias daí para a frente):

Grupo A (dose baixa): fase de carga de 2 mg de Anti-EpCAM/kg de peso corporal, semanalmente (dias 1,8, 15), seguido de 23 doses de manutenção de 2 mg de Anti-EpCAM/kg de peso corporal, a cada segunda semana.



Grupo B (dose elevada): fase de carga de 6 mg de Anti-EpCAM/kg de peso corporal, semanalmente (dias 1, 8, 15), seguido de 23 doses de manutenção de 6 mg de Anti-EpCAM/kg de peso corporal, a cada segunda semana.

As doses pretendidas neste estudo levaram a parâmetros farmacocinéticos (*i.e.*,  $C_{max}$  e AUC) que não excederam os medidos com as doses mais elevadas administradas a pacientes no estudo de fase I.

As fases de carga e fases de manutenção foram calculadas utilizando modelação farmacocinética para se obterem concentrações séricas mínimas alvo num curto período de tempo e para evitar concentrações plasmáticas que pudessem exceder as determinadas no estudo de fase I.

A FIGURA 6 mostra uma simulação de uma administração bissemanal de Anti-EpCAM descrita acima, incluindo uma fase de carga com um nível sérico mínimo de 30 µg/mL. A FIGURA 7 mostra uma simulação de uma administração bissemanal de Anti-EpCAM descrita acima, incluindo uma fase de carga com um nível sérico mínimo alvo de 10 µg/mL.

As FIGURAS 6 e 7 mostram as administrações respectivas de fármacos ao longo de uma escala de tempo de 120 dias.

Podem-se observar concentrações séricas de pico e mínimas, sendo os níveis de pico representados pelas porções superiores da curva e os níveis mínimos representados pela parte inferior das curvas. Os gráficos representam as simulações para se obter os diferentes níveis mínimos acima referidos de 10 e 30 µg/ml, respectivamente. Como se pode ver pelas figuras, as concentrações séricas de pico e mínimas são diferentes nas duas simulações.

### **Exemplo 3: Dados de toxicidade Anti-EpCAM, comparação com ING-1, extrapolação**

A seguir descrevem-se os eventos adversos (EA) observados para as várias coortes de pacientes. Para os fins do seguinte, um EA é definido como qualquer ocorrência médica desfavorável num paciente, ou indivíduo de investigação clínica a quem se

administra um produto farmacêutico e que não tem necessariamente uma relação causal com este tratamento. Pode portanto ser um sinal desfavorável e não intencional (incluindo dados laboratoriais anormais), sintoma ou doença temporariamente associada com a utilização do produto em investigação, quer relacionado ou não com o produto de investigação.

As reacções adversas de fármacos (*i.e.* , EA considerado pelo menos possivelmente relacionado com o fármaco em estudo pelo investigador) foram avaliadas pelo investigador, de acordo com os critérios de toxicidade comum do NCI (CTC, versão 2.0). Para reacções adversas de fármacos não enumeradas nas tabelas de CTC do NCI, devem seguir-se as definições gerais para classificar a gravidade dos efeitos adversos. Deste modo, um EA "ligeiro" descreve um sintoma de que o paciente mal se apercebe. Não interfere com as actividades usuais ou performance do paciente e/ou não tem qualquer consequência clínica. Um EA "moderado" interfere com as actividades normais do indivíduo e é suficiente para causar desconforto ao indivíduo. Tem algumas consequências clínicas; poderá ser necessário o tratamento de sintomas. Um EA "grave" é um evento que provoca um desconforto grave e pode ser de uma gravidade tal que o tratamento em estudo tenha que ser descontinuado. O indivíduo é incapaz de trabalhar normalmente ou desenvolver as actividades normais e/ou a EA é de consequência clínica definida. Poderá ser necessário o tratamento de sintomas. Um "evento adverso grave" (EAG) é definido como qualquer ocorrência médica desfavorável que, a qualquer dose: resultou em morte, acarretou risco de vida, obrigou a hospitalização ou prolongamento de hospitalização em curso, resultou em inabilidade/incapacidade persistente ou significativa, ou era uma anomalia congénita/defeito de nascença.

Foi referido um total de 120 efeitos adversos (EA), independentemente de uma relação com o fármaco de estudo, em 19 (95%) pacientes durante o tratamento e o período de monitorização de segurança de 28 dias após a última infusão. Foram referidos mais efeitos adversos em pacientes da coorte 6 (38 eventos) e na coorte 7 (35 eventos), em comparação com as coortes de doses mais baixas (coorte 1: 7; coorte 2: 9; coorte

3: 12; coorte 4: 7; coorte 5: 12). As coortes são apresentadas na Figura 1, explicada acima no Exemplo 1.

Os EA clínicos emergentes do tratamento, mais frequentes, independentemente da determinação por parte do investigador de uma relação com o fármaco de estudo eram aumento de temperatura (referido em 30% de todos os pacientes), náusea (30%), pirexia (20%), diarreia (15%), fadiga (15%), sensação de frio (15%) e vômitos (15%). As alterações laboratoriais mais frequentes emergentes do tratamento, referidas como efeitos adversos, independentemente da determinação por parte do investigador de uma relação com o fármaco de estudo, eram fosfatase alcalina elevada (referida em 30% de todos os pacientes), linfopenia (30%), LDH elevada (25%), diminuição de PTT (20%), diminuição de hemoglobina (20%), distúrbios dos glóbulos brancos (15%), glicosúria (15%) e transaminases elevadas (15%).

A maioria dos eventos adversos eram ligeiros (70%) ou moderados (25%). Foram referidos seis efeitos adversos graves (grau 3) em quatro pacientes, como se segue: Fosfatase alcalina elevada num paciente com valor moderado (grau 2) antes do tratamento; Glicosúria num paciente com uma diabetes *mellitus* conhecida; um paciente com hemoglobina e glóbulos vermelhos diminuídos e perda de peso; um paciente com hérnia discal intervertebral. Nenhum dos eventos estava relacionado com o fármaco de estudo, tal como determinado pelo investigador. Não foi referido nenhum evento de grau 4.

Foram referidos quatro eventos adversos graves (EAG) em 4 pacientes, durante o período de estudo. Um, o investigador considerou que estava possivelmente relacionado com a medicação em estudo: um prolongamento da hospitalização devido a febre de grau 1, após a 2ª infusão de Anti-EpCAM num paciente da coorte 3 (40 mg/m<sup>2</sup> área de superfície corporal).

Estudos clínicos com o anticorpo anti-EpCAM ING-1 quimérico ratinho-humano ( $K_D$ :  $2 \times 10^{-9}$ ) resultaram em pancreatite a uma dose de 1 mg/kg. Estes eventos adversos eram dependentes da dose com um MTD claro. É possível que a afinidade da imunoglobulina ING-1 para o antígeno EpCAM, superior em duas ordens de grandeza em comparação com Anti-

EpCAM, esteja relacionada com o perfil de toxicidade observado para ING-1. Uma vez que a MTD de ING-1 (1 mg/kg) e as doses mais elevadas pretendidas no protocolo Anti-EpCAM (6 mg/kg) são semelhantes, é esperado que o Anti-EpCAM, a imunoglobulina dos estudos anteriores, tenha uma margem de segurança significativamente mais elevada, possivelmente devido à sua muito menor afinidade.

#### **Exemplo 4: Expressão de EpCAM na doença**

De forma a determinar a gama de aplicabilidade do método de tratamento aqui descrito, estudou-se a expressão do antigénio EpCAM humano em várias doenças diferentes. É esperado que o método da invenção seja eficazmente aplicado a qualquer doença em que a expressão de EpCAM está elevada no estado de doença, em relação ao estado saudável de um determinado tecido. Em particular, deu-se especial atenção à síntese do antigénio EpCAM no tecido do fígado.

**Pacientes e Tecidos.** Caracterizaram-se no total 254 espécimes de tecido de fígado diferentes, por imuno-histologia para EpCAM e para parâmetros morfológicos relevantes, como descrito a seguir. Analisaram-se amostras de tumor diferentes, incluindo 63 HCC, 5 colangiocarcinomas do fígado e 30 nódulos displásicos (lesões precursoras hepatocelulares pré-malignas), bem como 5 espécimes de fígado normais. Recolheram-se 33 biópsias de pacientes com hepatite C crónica, 27 de pacientes com hepatite B crónica e 28 dos que têm doença de fígado alcoólica crónica (ALD); 9 pacientes tinham hepatite auto-imune (AIH). Os tecidos de fígado foram obtidos por biópsia utilizando uma agulha Menghini e no caso de HCC por ressecção ou explante de fígado. Os tecidos foram imediatamente fixados em formaldeído tamponado neutro a 4% e processados de acordo com protocolos convencionais.

**Avaliação morfológica.** A avaliação morfológica foi realizada na base de secções coradas com H & E (gradação de carcinomas e hepatite crónica). A gradação de HCC foi realizada como descrito em Nzeako et al., Cancer 76,1995, 579-88. As doenças de fígado não neoplásicas foram avaliadas morfológicamente como se segue: A actividade necro-inflamatória de casos de hepatite B e C crónica foi analisada

utilizando o índice de actividade hepática modificado como descrito em Ishak, Mod. Pathol. 7,1994, 90-713.

**Avaliação imuno-histológica.** A imuno-histologia foi realizada como anteriormente descrito (Prange et al., J. Pathol. 201,2003, 250-9) utilizando o designado método ABC e diaminobenzidina como cromogénio. Diluiu-se a 1/50 anticorpo monoclonal de rato anti-EpCAM humano (clone VU-1D9; Novocastra, Newcastle, RU) e aplicou-se um pré-tratamento com tripsina de 30 min (0,1%, pH 7,8). A imuno-histologia para ciclina D1 (DCS-6; 1: 100; DAKO, Hamburgo, Alemanha), p53 (FL-393; 1: 50; Santa Cruz, Santa Cruz, EUA), e ubiquitina (70458; 1: 200; DAKO) foi realizada em concordância. Fizeram-se controlos negativos, incluindo omissão do anticorpo primário.

Para avaliação da coloração de EpCAM em HCC apenas se fez a gradação semi-quantitativa da intensidade (0 = negativo, + (1) = fracamente positivo, ++ (2) = moderadamente positivo, +++ (3) = fortemente positivo (pelo menos intensidade igual à coloração do ducto biliar)). A expressão hepatocelular de EpCAM em espécimes de biópsia não neoplásicos foi classificada como se segue: 0 = nenhuma coloração hepatocelular; (+) (0,5) = poucos hepatócitos positivos, disperses, + (1) = pequenos grupos de hepatócitos ao longo de vários ou da maioria dos septos ou vias portais, ++ (2) = grupos grandes de hepatócitos positivos em torno de vários ou da maioria das vias portais ou septos e estendendo-se até à zona médio-acinar, +++ (3) = positividade hepatocelular extensa, abrangendo tipicamente pelo menos 50% do ácino. A avaliação estatística foi realizada utilizando estatística descritiva (média, mediana, máximo, frequência) e o coeficiente de correlação de Spearman. Um nível de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Neo-expressão de EpCAM em HCC.** O tecido de fígado normal apresentava uma coloração forte de todos os epitélios do ducto biliar, enquanto que os hepatócitos eram completamente negativos (dados não apresentados). A imuno-histologia para EpCAM mostrou uma coloração membranar específica em 9 de entre os 63 HCC analisados (14,3%; Figuras 8A-F) e em todos os colangiocarcinomas do fígado analisados (n=5). Nos HCC, a expressão variou de fraca a forte e parecia ser mais frequente em HCC moderada e fracamente diferenciados, enquanto que

apenas um HCC bem diferenciado era positivo. Adicionalmente, entre 30 nódulos displásicos, que representam lesões pré-malignas, apenas 3 apresentavam uma expressão ligeira de EpCAM. Os mesmos tecidos foram analisados para vários antígenos relevantes para o tumor e os dados de expressão foram submetidos a análises de correlação. Havia uma correlação moderada mas positiva significativa de expressão de EpCAM em HCC, com acumulação nuclear de p53 e ubiquitina ( $p < 0,05$ ), mas não de ciclina D1 reguladora a montante, suspeita.

**Neo-expressão hepatocelular de EpCAM na doença de fígado necro-inflamatória crónica.** Detectou-se positividade membranar específica de hepatócitos numa percentagem elevada dos tecidos de fígado não neoplásicos analisados (Figuras 8C-E). Encontrou-se positividade acentuada em casos com hepatite crónica e numa menor extensão nos que têm ALD. Além disso, foi observada positividade de proliferações dos ductos e também de células pequenas individuais dispersas no parênquima periportal (células precursoras potenciais). A positividade hepatocelular mostrou predominância periportal/perisseptal forte e atingiu a intensidade da coloração do ducto biliar nalguns casos. Não estava presente nenhuma reactividade específica para EpCAM em células de fígado não parenquimatosas, em nenhum dos casos.

Quando se analisaram os valores médios e medianos da pontuação imuno-histológica semi-quantitativa (ver métodos), a expressão de EpCAM era mais elevada em tecidos com infecção de HBV (pontuação média: 0,93; pontuação mediana: 0,5; pontuação máxima: 3; frequência de coloração de EpCAM positiva (+/++/+++): 55,6%;), ALD (pontuação média: 0,88; pontuação mediana: 0,75; pontuação máxima: 2,5; frequência de coloração de EpCAM positiva (+/++/+++): 78,6%;), e infecção por HCV (pontuação média: 0,86; pontuação mediana: 0,5; pontuação máxima: 3; frequência de coloração de EpCAM positiva (+/++/+++): 63,6%). Os pacientes com AIH tinham uma coloração de EpCAM intermédia (pontuação média: 0,72; pontuação mediana: 0,5; pontuação máxima: 3; frequência de coloração de EpCAM positiva (+/++/+++): 55,6%;). A expressão de EpCAM hepatocelular estava quase ausente em pacientes com doença biliar crónica PBC (pontuação média: 0,13; pontuação mediana: 0; pontuação máxima: 0,5; frequência de EpCAM positivos

coloração (+/++/+++) : 25,0%;) e PSC (pontuação média: 0,04; pontuação mediana: 0; pontuação máxima: 0,5; frequência de coloração de EpCAM positiva (+/++/+++): 7,7%;) (Figura 9; a descrição de variáveis estatísticas é apresentada na figura à direita no gráfico).

Conclusão. Analisaram-se amostras de tecido de pacientes com doença do fígado crónica, tal como infecção crónica pelo vírus de hepatite C (HCV) e vírus de hepatite B (HBV), hepatite auto-imune crónica (AIH), doença de fígado alcoólica crónica (ALD) e carcinoma hepatocelular (HCC) semi-quantitativamente, quanto à expressão de EpCAM em correlação com o estágio de fibrose pulmonar, bem como parâmetros histológicos e bioquímicos de actividade necro-inflamatória. Os hepatócitos, que são negativos para EpCAM no fígado adulto normal, apresentavam expressão de EpCAM de novo em muitos tecidos do fígado de pacientes com doenças de fígado crónicas. A expressão hepatocelular de EpCAM era mais elevada em pacientes com doenças necro-inflamatórias (hepatite HCV e HBV, AIH, ALD). A expressão hepatocelular de EpCAM correlacionava-se significativamente com parâmetros histológicos e bioquímicos de actividade inflamatória e a extensão da fibrose que era particularmente notória em pacientes com infecção por HBV.

Além disso, 14,3% dos HCC apresentavam expressão de EpCAM em células tumorais.

Os resultados demonstram que a expressão de EpCAM de novo ocorre apenas numa fracção de carcinomas hepatocelulares (HCC), mas frequentemente em hepatócitos em doenças de fígado necro-inflamatórias, crónicas. Esta expressão correlaciona-se positivamente com a actividade da doença e fibrose. Especificamente, foi demonstrada uma correlação entre a neo-expressão de EpCAM hepatocelular na doença de fígado necro-inflamatória crónica e fibrose e actividade necro-inflamatória. Estas observações têm implicações para opções de tratamento futuras, tais como anticorpos monoclonais dirigidos para EpCAM em tumores malignos e podem também aplicar-se a alguns HCC. Como consequência específica, uma fracção das HCC pode representar um alvo válido para terapia de anticorpos dirigidos para EpCAM.

**Exemplo 5: Corroboração de previsões farmacocinéticas utilizando dados de pacientes obtidos num estudo de fase II de "Anti-EpCAM".**

Desejava-se confirmar o rigor das previsões com base em modelação farmacocinética (elas próprias baseadas em dados farmacocinéticos obtidos do estudo de fase I de Anti-EpCAM, ver Exemplos 1 e 2 acima) utilizando dados de pacientes efectivos obtidos de um estudo de fase II subsequente, em que o Anti-EpCAM foi administrado de acordo com a invenção. Este estudo de fase II era um estudo de fase II internacional, aberto, multicêntrico, randomizado, com dois grupos de tratamento paralelos. Os pacientes que participam no estudo de fase II Anti-EpCAM foram divididos aleatoriamente em dois grupos, o primeiro dos quais recebeu uma dose baixa de Anti-EpCAM (2 mg/kg de peso corporal) administrada como explicado a seguir e o segundo recebeu uma dose elevada de Anti-EpCAM (6 mg/kg de peso corporal) administrada como explicado a seguir. Ao longo do estudo de fase II de Anti-EpCAM, cada paciente recebeu inicialmente três doses de carga de Anti-EpCAM (cada um, ou 2 mg/kg de peso corporal ou 6 mg/kg de peso corporal, dependendo do grupo do paciente) espaçadas com intervalos de uma semana durante a fase de carga, seguido de até 23 doses de manutenção subsequentes de Anti-EpCAM (mais uma vez, ou 2 mg/kg de peso corporal ou 6 mg/kg de peso corporal, dependendo do grupo do paciente), tendo-se administrado doses de manutenção individuais a cada segunda semana.

De acordo com as previsões farmacocinéticas baseadas em dados de estudos de fase I de Anti-EpCAM, era esperado que o nível sérico mínimo do primeiro grupo de pacientes que recebeu a dose baixa de Anti-EpCAM fosse da ordem de 10 µg/ml (correlacionado com o nível mínimo apresentado na Figura 7), enquanto que era esperado que o nível sérico mínimo do segundo grupo de pacientes que receberam a dose elevada de Anti-EpCAM fosse da ordem de 30 µg/ml (correlacionado com o nível mínimo apresentado na Figura 6).

O ensaio foi realizado como se segue. Revestiram-se placas de 96 poços com HD4A4 (anticorpo anti-idiotipo contra Anti-EpCAM; 5 µg/ml num volume de 100 ml) seguido de um passo de bloqueio e lavagem. Adicionaram-se padrões de calibração,



amostras de controlo de qualidade e amostras de Anti-EpCAM (100 µl numa diluição adequada) seguido de um passo de lavagem. O Anti-EpCAM ligado por HD4A4 foi detectado com uma IgG anti-humana biotinilada, mais uma vez seguido de um passo de lavagem.

Adicionou-se estreptavidina (0,5 mg/ml num volume de 100 µl), a placa de 96 poços foi lavada mais uma vez e num passo final adicionaram-se 180 µl de pNPP. O ensaio foi parado com 50 µl de NaOH 3 M e medido num leitor ELISA a 405 e 490 nm. Fez-se uma diluição de amostras de dose baixa numa relação de 1:100. A diluição de amostras de dose elevada foi realizada numa relação de 1: 300. Os resultados são apresentados na Figura 10.

A figura 10 mostra como pontos os níveis individuais mínimos medidos para um paciente do grupo de dosagem baixa (paciente número 401001; os pontos de dados estão indicados por quadrados) e outro paciente do grupo de dosagem elevada (paciente número 101002; pontos de dados indicados por losangos). O nível vertical médio da linha horizontal que liga os pontos de dados de um paciente respectivo representa o nível sérico mínimo observado para esse paciente. Deste modo, pode ver-se que a linha horizontal para o paciente de dose elevada 101002 (pontos de losangos) indica uma concentração de Anti-EpCAM de nível mínimo em concordância com o valor previsto de 30 µg/ml para esta dose (comparar a linha horizontal que liga os valores mínimos previstos do gráfico na figura 6). De igual modo, a linha horizontal para o paciente de dose baixa 401001 (pontos de quadrados) indica uma concentração de nível mínimo de Anti-EpCAM em concordância com o valor previsto de 10 µg/ml para esta dose (comparar a linha horizontal que liga os valores mínimos previstos do gráfico na Figura 7).

Estes dados corroboram o rigor das previsões do nível mínimo por modelação farmacocinética baseada em dados obtidos durante o estudo de fase I de Anti-EpCAM com dados de paciente efectivos, obtidos durante o estudo de fase II de Anti-EpCAM. Deste modo, pode concluir-se que as assunções e resultados da modelação farmacocinética estavam correctos e que o regime de tratamento de acordo com a invenção tem os efeitos e vantagens acima elaborados.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

&lt;110&gt; Micromet AG

&lt;120&gt; Imunoglobulinas Anti-EpCAM

&lt;130&gt; MIC-022 PCT

&lt;140&gt; desconhecido

&lt;141&gt; 2005-02-09

&lt;150&gt; US 10/778,915

&lt;151&gt; 2004-02-13

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 457

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadeia Pesada de Anti-EpCAM

&lt;400&gt; 1

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
100          105          110
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115          120          125
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
130          135          140
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145          150          155          160
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165          170          175

```

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 180 185 190  
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 210 215 220  
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadeia Leve de Anti-EpCAM

&lt;400&gt; 2

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

Lisboa, 2009-10-12

REIVINDICAÇÕES

1. Imunoglobulina humana que se liga especificamente ao antigénio EpCAM humano, caracterizada por a referida imunoglobulina humana exibir uma semivida sérica de pelo menos 15 dias após administração a um paciente humano e compreender uma cadeia pesada de imunoglobulina com uma sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO:1 e uma cadeia leve de imunoglobulina com uma sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO:2.

2. Imunoglobulina humana de acordo com a reivindicação 1, em que a semivida sérica é de 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias ou 15 dias.

3. Imunoglobulina humana de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a semivida é de 15 dias.

4. Composição farmacêutica compreendendo a imunoglobulina humana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3.

5. Utilização da imunoglobulina humana de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um medicamento para tratar uma doença tumoral, em que o referido medicamento é formulado para administração a um paciente humano, com uma frequência não superior a uma vez por semana.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido medicamento é formulado para administração com uma frequência não superior a uma vez de duas em duas semanas.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o referido medicamento é formulado para administração de duas em duas semanas e a dose administrada da referida imunoglobulina humana permanece inalterada de uma administração até a seguinte.

8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-7, em que o referido medicamento é formulado para administração com uma frequência inferior a uma vez de duas em duas semanas, sendo a dose administrada da referida

imunoglobulina humana estabelecida de modo a que no final do tempo de intervenção entre duas administrações respectivas, a quantidade de referida imunoglobulina humana que persiste no soro nunca desce abaixo de um nível sérico mínimo, determinado como necessário para uma eficácia terapêutica.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-8, em que o medicamento é formulado para administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica.

10. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-9, em que a doença tumoral é cancro da mama, cancro epitelial, carcinoma hepatocelular, cancro colangiocelular, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro da próstata, cancro da cabeça e pescoço, cancro da pele (melanoma), um cancro do tracto urogenital, e.g., cancro dos ovários, cancro endometrial, cancro cervical e cancro do rim; cancro do pulmão, cancro gástrico, um cancro do intestino delgado, cancro do fígado, cancro do pâncreas, cancro da bexiga, um cancro do ducto biliar, cancro do esófago, um cancro das glândulas salivares ou um cancro da glândula tiróide.

11. Imunoglobulina humana de acordo com a reivindicação 1, para utilização no tratamento de uma doença tumoral, em que o tratamento ocorre por administração da referida imunoglobulina humana a um paciente humano, com uma frequência não superior a uma vez por semana.

12. Imunoglobulina humana para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o referido tratamento ocorre por administração da referida imunoglobulina humana com uma frequência não superior a uma vez de duas em duas semanas.

13. Imunoglobulina humana para utilização de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que o referido tratamento ocorre por administração da referida imunoglobulina humana de duas em duas semanas e a dose administrada da referida imunoglobulina humana permanece inalterada de uma administração até à seguinte.

14. Imunoglobulina humana para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 11-13, em que o referido tratamento ocorre por administração da referida imunoglobulina humana com uma frequência inferior a uma vez de duas em duas semanas, sendo a dose administrada da referida imunoglobulina humana administrada estabelecida de modo a que no final do tempo de intervenção entre duas administrações respectivas, a quantidade da referida imunoglobulina humana que persiste no soro nunca desça abaixo de um nível sérico mínimo determinado como necessário para uma eficácia terapêutica.

15. Imunoglobulina humana para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 11-14, em que o referido tratamento ocorre por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica.

Lisboa, 2009-10-12

RESUMO

**"Imunoglobulinas anti-EpCAM"**

A invenção refere-se *inter alia* a um método para tratar doenças tumorais num paciente humano por administração ao paciente de uma molécula de imunoglobulina humana que se liga especificamente ao antigénio EpCAM humano, exibindo a imunoglobulina uma semivida sérica de pelo menos 15 dias, e compreendendo o método o passo de administrar a imunoglobulina com uma frequência não superior a uma vez por semana, de preferência com uma frequência não superior a uma vez de duas em duas semanas.



Fig. 1

Coorte	Dose [mg/m <sup>2</sup> ]	Dose [mg/Kg]	N.º de pacientes
1	10	~0.22	2
2	20	~0.45	3
3	40	~0.93	3
4	64	~1.4	3
5	102	~2.4	3
6	164	~4	3
7	262	~6.5	3

Fig. 2

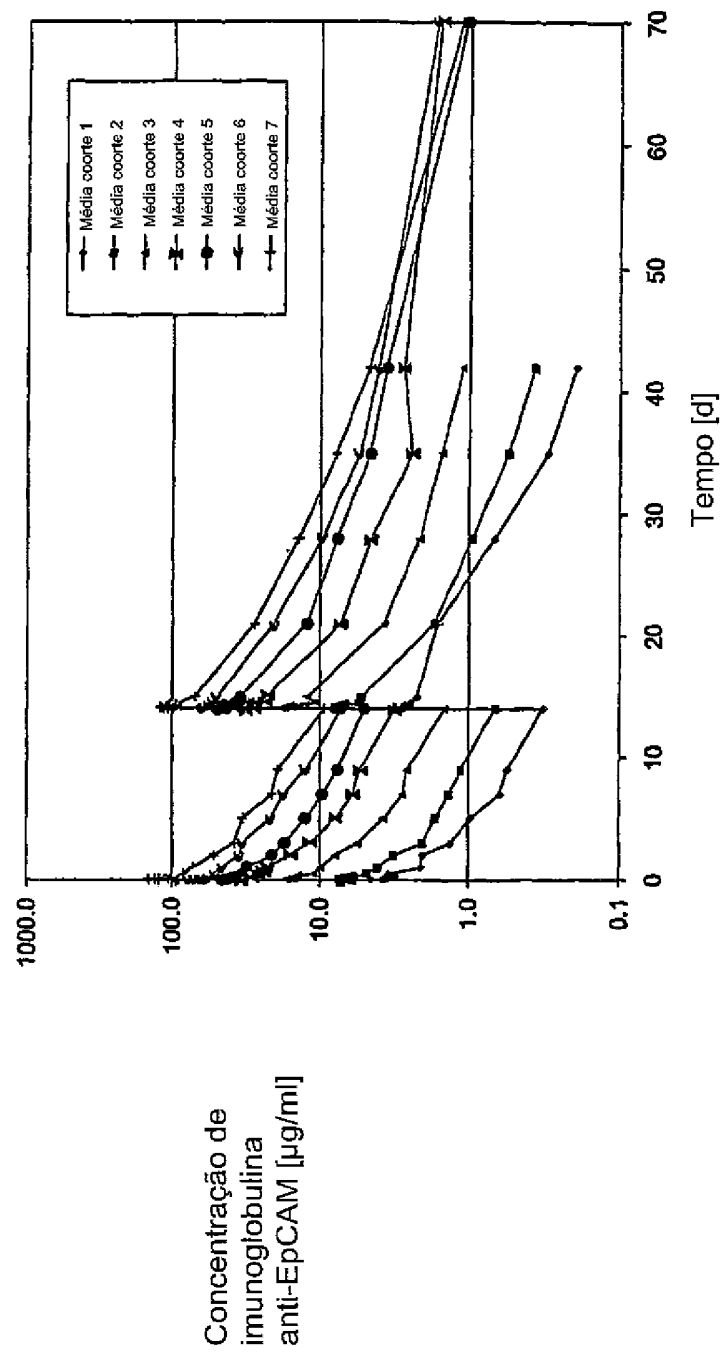


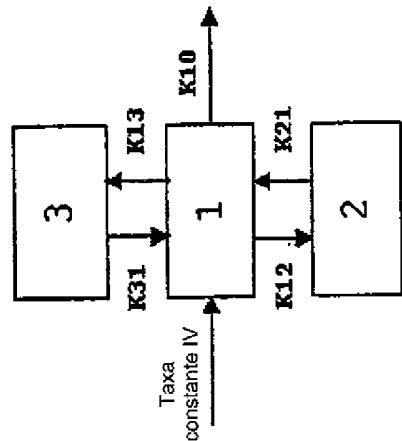
Fig. 3

Dose individual	Dose mg/m <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> dia	V <sub>z</sub> L	Cl <sub>z</sub> L/dia	C <sub>max</sub> µg/mL	AUC <sub>último (0-14)</sub> dia*µg/ml	AUC <sub>inf</sub> dia*µg/ml
Coorte 1	10	6.07	11.10	1.254	4.6	14.3	16.92
Coorte 2	20	7.11	12.78	1.287	7.8	26.4	34.01
Coorte 3	40	7.19	11.29	1.158	16.8	59.6	76.4
Coorte 4	64	7.42	9.79	0.988	39.7	124.2	160.7
Coorte 5	102	7.83	10.15	0.904	46.2	178.8	236.7
Coorte 6	164	5.62	8.02	0.980	78.3	297.5	354.6
Coorte 7	262	5.77	9.34	1.146	150.5	425.6	505.4
Média		6.72	10.35	1.10			
DP		0.88	1.53	0.15			
CV		13.1	14.8	13.3			
Min		5.62	8.02	0.90			
Max		7.83	12.78	1.29			
Geomédia		6.67	10.25	1.09			
Mediana		7.11	10.15	1.15			

Fig. 4

Dose individual	Dose mg/m <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> dia	V <sub>ss</sub> L	Cl <sub>ss</sub> L/dia	C <sub>max</sub> µg/mL	AUC <sub>T</sub> (14-28) dia*µg/ml	AUC <sub>inf</sub> dia*µg/ml
Coorte 1	10	10.01	11.42	1.063	3.4	22.46	30.60
Coorte 2	20	10.78	10.62	1.168	8.9	36.6	50.94
Coorte 3	40	14.20	11.88	1.046	18.3	81.7	131.7
Coorte 4	64	16.95	11.92	0.941	34.7	158.7	288.3
Coorte 5	102	16.11	12.11	0.878	51.1	246.0	411.0
Coorte 6	164	22.37	12.78	0.956	74.6	365.8	601.2
Coorte 7	262	12.77	9.98	1.034	127.1	563.4	788.4
Média		14.74	11.53	1.01			
DP		4.23	0.95	0.10			
CV		28.7	8.2	9.4			
Min		10.01	9.98	0.88			
Max		22.37	12.78	1.17			
Geomédia		14.25	11.50	1.01			
Mediana		14.20	11.88	1.03			

Fig. 5



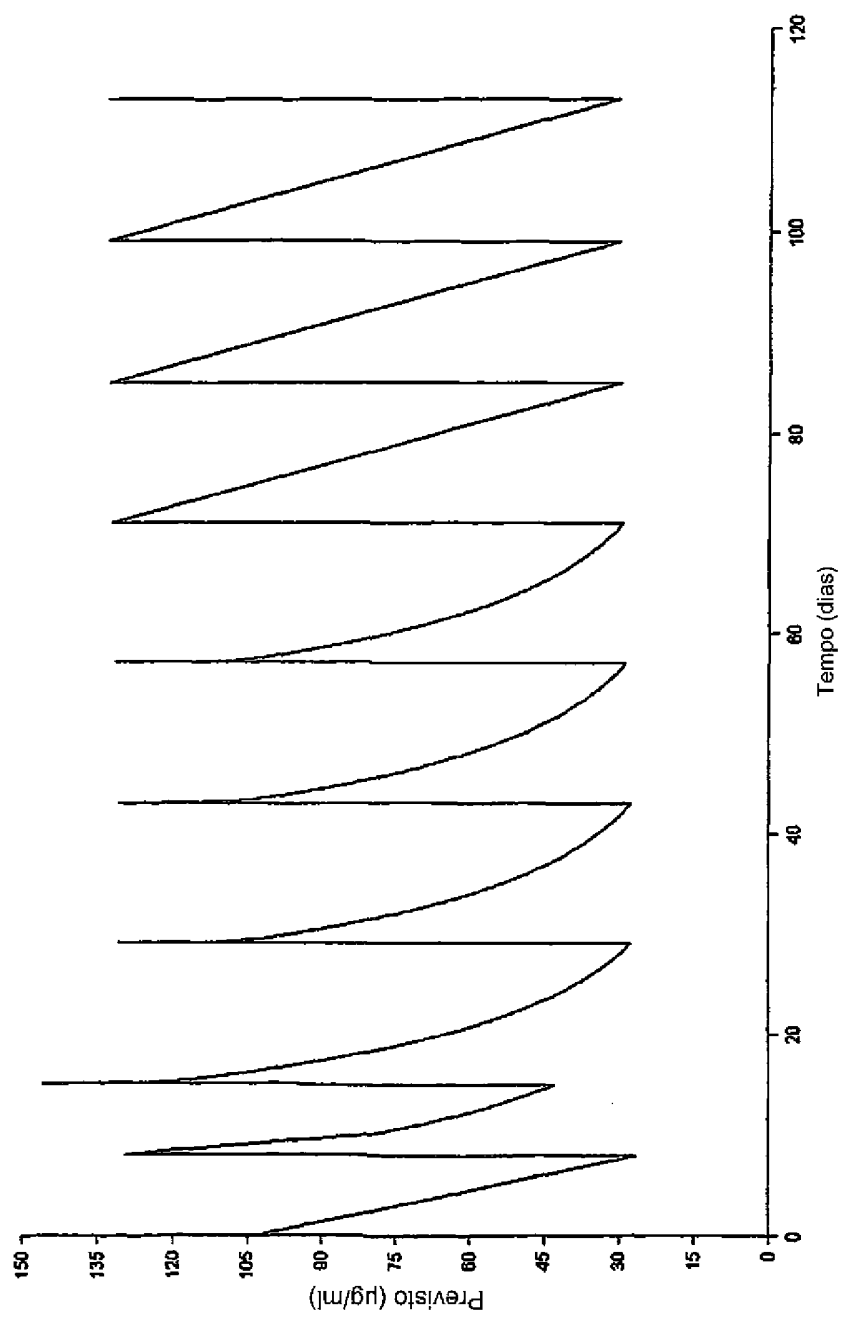


Fig. 6

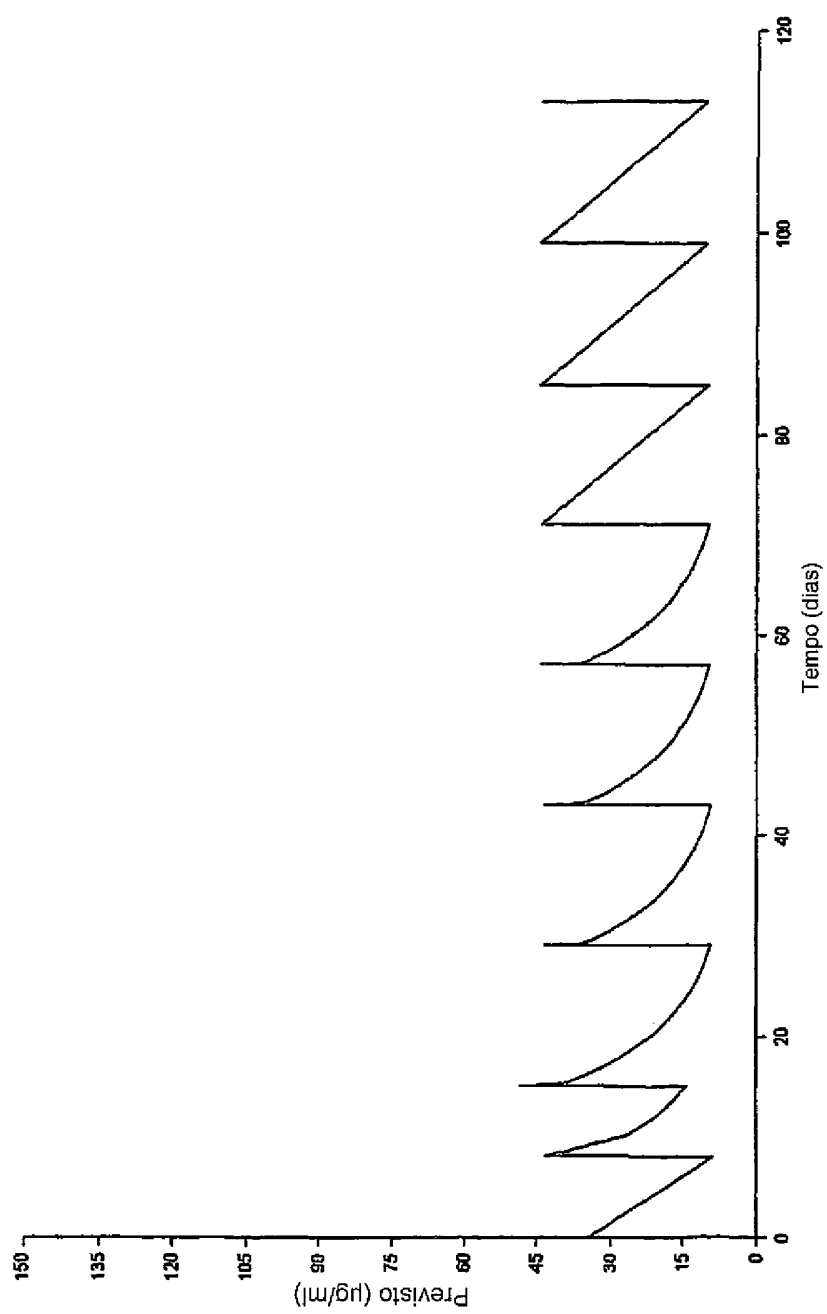


Fig. 7

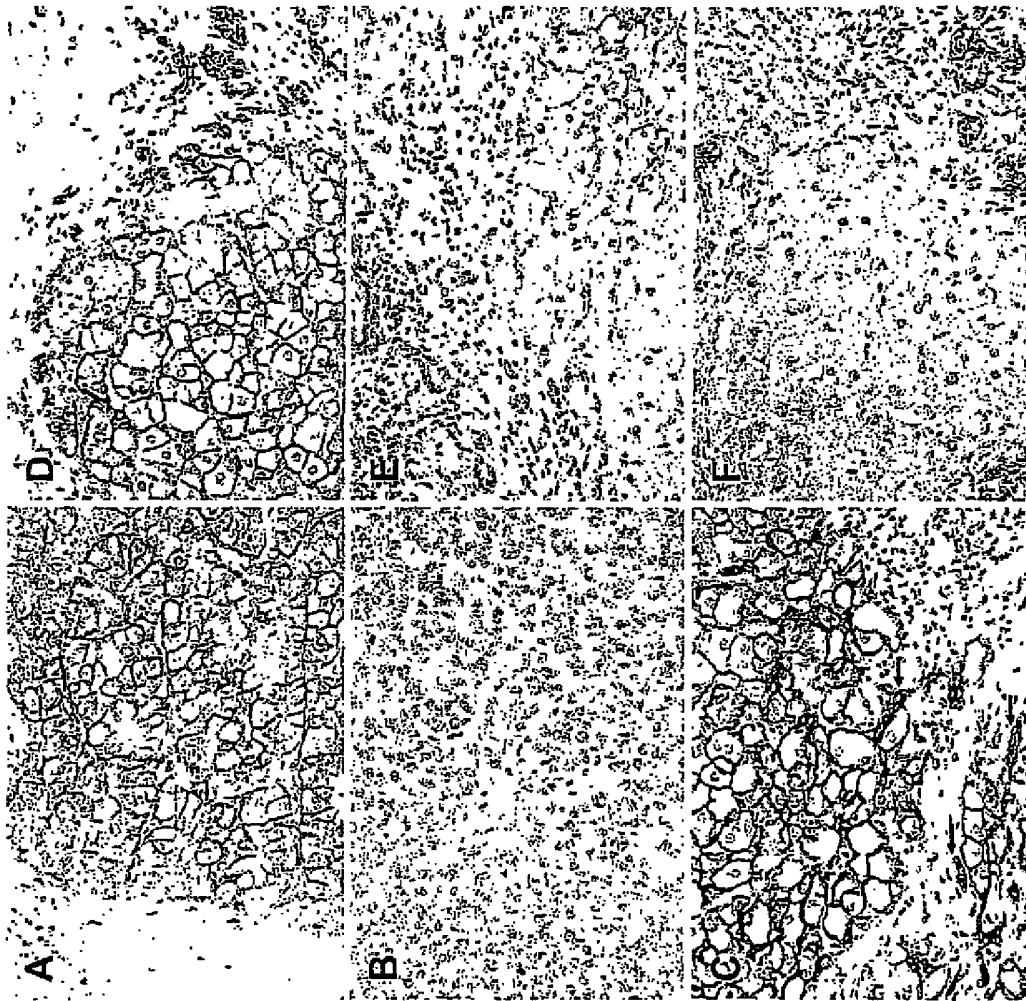
**Fig. 8**



Fig. 9

