



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

**(21) PI 0808055-0 A2**



\* B R P I 0 8 0 8 0 5 5 A 2 \*

**(22) Data de Depósito: 15/02/2008**

**(43) Data da Publicação: 30/07/2013**  
**(RPI 2221)**

**(51) Int.Cl.:**

A61K 39/395  
A61P 35/00

**(54) Título:** ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, HIBRIDOMA, KIT, USO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UM CÂNCER ASSOCIADO COM ERBB3 EM UM PACIENTE, E, ANTICORPO

**(30) Prioridade Unionista:** 16/02/2007 US 60/901904, 02/01/2008 US 61/009796, 02/01/2008 US 61/009796, 16/02/2007 US 60/901904

**(73) Titular(es):** Merrimack Pharmaceuticals, Inc.

**(72) Inventor(es):** Birgit Schoeberl, Michael Feldhaus, Ulrik Nielsen

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2008002119 de 15/02/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/100624 de 21/08/2008

**(57) Resumo:** "ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MAMÍFERO TRANSGÊNICO NÃO HUMANO, PLANTA TRANSGÊNICA, HIBRIDOMA, KIT, E, MÉTODOS PARA INIBIR A FOSFORILAÇÃO DO ERBB3 MEDIADA PELO LIGANDO SEMELHANTE A EGF EM UM PACIENTE, PARA TRATAR CÂNCER EM UM PACIENTE E PARA DIAGNOSTICAR UM CÂNCER ASSOCIADO COM ERBB3 EM UM PACIENTE". A presente invenção fornece uma nova classe de anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor de ErbB3 e inibem várias funções do ErbB3. Por exemplo, os anticorpos aqui descritos são capazes de ligarem-se ao ErbB3 e de inibirem a fosforilação do receptor mediada pelo ligando semelhante ao EGF.

“ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, HIBRIDOMA, KIT, USO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL 5 ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UM CÂNCER ASSOCIADO COM ErbB3 EM UM PACIENTE, E, ANTICORPO”

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A subfamília ErbB/HER de receptores do fator de crescimento de polipeptídeos inclui o receptor (EGFR, ErbB1/HER1) do fator de crescimento epidérmico (EGF), o produto do oncogene *neu* (ErbB2/HER2), e as proteínas dos receptores ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 mais recentemente identificadas [ver, por exemplo, Hynes *et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta Ver. Cancer* 1198, 165-184]. Cada 10 um destes receptores é prognosticado consistir de um domínio extracelular de ligação a ligando, um domínio que transpõe a membrana, um domínio cistólico da tirosina quinase protéica (PTK) e um domínio 15 de fosforilação C-terminal [ver, por exemplo, Kim *et al.*, (1998) *Biochem. J.* 334, 189-195].

20 Experiências *in vitro* têm indicado que a atividade da tirosina quinase protéica da proteína ErbB3 é atenuada significativamente em relação àquela dos outros membros da família ErbB/HER, e esta atenuação tem sido atribuída, em parte, à ocorrência de substituições não conservativas de aminoácidos no domínio catalítico prognosticado do ErbB3 [ver, por exemplo, Guy *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8132-8136; Sierke 25 *et al.* (1997) *Biochem. J.* 322, 757-763]. Entretanto, a proteína ErbB3 tem sido apresentada ser fosforilada em uma variedade de contextos celulares. Por exemplo, o ErbB3 é constitutivamente fosforilado nos resíduos de tirosina em

um subconjunto das linhagens celulares do câncer de mama humano sobreexpressando esta proteína [ver, por exemplo, Kraus *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2900-2904; e Kim *et al.* Supra; ver também Schaefer *et al.* (2006) *Neoplasia* 8(7): 613-622 e Schaefer *et al.* *Cancer Res.* 5 (2004) 64(10): 3395-3405].

Não obstante, o papel do ErbB3 no câncer foi explorado (ver, por exemplo, Horst *et al.* (2005) 115, 519-527; Xue *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426, o ErbB3 permanece amplamente não apreciado como um alvo para intervenção clínica. As imunoterapias correntes principalmente 10 focalizam-se em inibir a ação do ErbB2 e, em particular, a heterodimerização dos complexos de ErbB2/ErbB3 [ver, por exemplo, Sliwkowski *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994)]. Consequentemente, é um 15 objeto da presente invenção fornecer imunoterapias que inibam eficazmente a sinalização de ErbB3 e possam ser usadas para tratar e diagnosticar uma variedade de cânceres.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece uma nova classe de anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor de ErbB3 e inibem várias funções do ErbB3. Por exemplo, os anticorpos aqui descritos são capazes de se ligarem 20 ao ErbB3 e de inibirem a fosforilação do receptor mediada pelo ligando semelhante ao EGF. Como aqui descrito, os ligandos semelhantes ao EGF incluem EGF, TGF- $\alpha$ , betacelulina, fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina, birregulina e anfirregulina, que se ligam a EGFR e induzem a dimerização de EGFR com ErbB3. Esta dimerização, por sua vez, 25 acarreta a fosforilação do ErbB3 e ativa a sinalização através do receptor. Os anticorpos monoclonais da presente invenção, assim, são úteis para tratar e diagnosticar uma variedade de cânceres associados com a sinalização celular mediada por ErbB3. Consequentemente, em uma forma de realização, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais (e suas porções de ligação

a antígeno) que se ligam ao ErbB3 e inibem a fosforilação do ErbB3 mediada pelo ligando semelhante ao EGF.

Em outra forma de realização, os anticorpos são ainda caracterizados por uma ou mais das seguintes propriedades: (i) inibição da sinalização mediada pelo ligando ErbB3, incluindo a sinalização mediada pela ligação dos ligandos de ErbB3, tais como a herregulina, epirregulina, epigênio e BIR, ao ErbB3; (ii) inibição da proliferação das células expressando ErbB3; (iii) a capacidade de reduzir níveis de ErbB3 sobre as superfícies celulares (por exemplo, pela indução da internalização do ErbB3); (iv) inibição da secreção do VEGF das células expressando ErbB3; (v) inibição da migração das células expressando ErbB3; (vi) inibição do crescimento esferóides das células expressando ErbB3; e/ou (vii) ligação a um epítopo localizado no domínio I (resíduos 20 a 202) da sequência de aminoácidos de ErbB3.

Os anticorpos monoclonais particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção apresentam um  $K_D$  de 50 mM ou menos, medido por um ensaio de ressonância de plásmon superficial ou um ensaio de ligação celular.

Em outras forma de realização, os anticorpos monoclonais particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção incluem uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que seja pelo menos 80 % (por exemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idêntica à sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada apresentada nas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 37, Outros anticorpos monoclonais particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção incluem uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % (por exemplo 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idêntica à sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada apresentada nas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 37. Outros anticorpos monoclonais particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção incluem uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % (por exemplo 85 %, 90 %, 5 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idêntica à sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve apresentada nas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 36 ou SEQ ID NO: 38. Os anticorpos podem também incluir tanto as regiões variáveis de cadeia pesada quanto de cadeia leve acima mencionadas.

10 As regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos ou de suas porções de ligação a antígeno tipicamente incluem uma ou mais regiões determinantes da complementaridade (CDRs). Estas incluem uma ou mais regiões de CDR1, CDR2 e CDR3. Consequentemente, outros anticorpos particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção 15 incluem uma ou mais sequências de CDR selecionadas de uma região de CDR1 variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 7; uma região de CDR2 variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 8; uma região CDR3 variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 9; uma região de CDR1 variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 10; uma região de CDR2 variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 11; uma região de CDR3 variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 12; e combinações das mesmas.

20 Ainda outras formas de realização particulares e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção incluem uma ou mais sequências de CDR selecionadas de uma região variável de CDR1 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 13; uma região variável de CDR2 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 14; uma região variável de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 15; uma região variável de CDR1 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 16; uma região variável 25

de CDR2 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 17; uma região variável de CDR3 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 18; e combinações das mesmas.

Ainda outras formas de realização particulares e suas porções 5 de ligação a antígeno da presente invenção incluem ou uma ou mais sequências de CDR selecionadas de uma região variável de CDR1 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 19; uma região variável de CDR2 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 20; uma região variável de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 21; uma região 10 variável de CDR1 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 22; uma região variável de CDR2 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 23; uma região variável de CDR3 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 24; e combinações das mesmas.

Ainda outras formas de realização particulares e suas porções 15 de ligação a antígeno da presente invenção incluem ou uma ou mais sequências de CDR selecionadas de uma região variável de CDR1 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 39; uma região variável de CDR2 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 40; uma região variável de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 41; uma região 20 variável de CDR1 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 42; uma região variável de CDR2 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 43; uma região variável de CDR3 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 44; e combinações das mesmas.

Ainda outras formas de realização particulares e suas porções 25 de ligação a antígeno da presente invenção incluem ou uma ou mais sequências de CDR selecionadas de uma região variável de CDR1 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 45; uma região variável de CDR2 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 46; uma região variável de CDR3 de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 47; uma região

variável de CDR1 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 48; uma região variável de CDR2 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 49; uma região variável de CDR3 de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 50; e combinações das mesmas.

5 Os anticorpos e suas porções de ligação a antígeno também podem compreender uma ou mais CDRs que são pelo menos 80 % (por exemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idênticas a qualquer das CDRs acima mencionadas, ou combinações das CDRs.

10 Em uma forma de realização, os anticorpos e suas porções de anticorpos são completamente humanos (isto é, contêm CDR humana e sequências de estrutura). Anticorpos humanos particulares da presente invenção incluem aqueles que têm uma região variável de cadeia pesada que seja de um gene da linhagem germinativa VH3 humana, e/ou uma região variável de cadeia leve do gene da linhagem germinativa VL2 humana.

15 Também abrangidos pela presente invenção são os anticorpos monoclonais e porções destes que se ligam ao mesmo ou sobrepõem os epítopos ligados por qualquer dos anticorpos ou porções destes aqui descritos (por exemplo, um epítopo localizado no domínio 1 do ErbB3, tal como um epítopo envolvendo ou transpondo os resíduos 20 a 202 da sequência de 20 aminoácidos de ErbB3). Os anticorpos que têm a mesma atividade dos anticorpos aqui descritos, por exemplo anticorpos tendo a mesma sequência de Ab #6, são também abrangidos pela presente invenção.

25 Os anticorpos da presente invenção incluem todas as formas conhecidas de anticorpos e outros esqueletos de proteína com propriedades semelhantes aos anticorpos. Por exemplo, o anticorpo pode ser um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico ou um esqueleto de proteína com propriedades semelhantes ao anticorpo, tais como a fibronectina ou as repetições de Ankyrin. O anticorpo também pode ser um Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, affibody, nanobody, ou um

anticorpo de domínio. O anticorpo também pode ter qualquer dos seguintes isótipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE.

5 Em ainda outra modalidade, a presente invenção ainda fornece composições compreendendo combinações de anticorpos ou porções de ligação a antígeno aqui descritos, formulados com um carreador e/ou adjuvante aceitável. Em uma modalidade particular, a composição compreende dois ou mais anticorpos que ligam diferentes epítopos no ErbB3 ou anticorpos aqui descritos combinados com anticorpos anticâncer que não ligam ErbB3.

10 Em ainda outra modalidade, a presente invenção fornece ácidos nucleicos isolados codificado os anticorpos e suas porções de ligação a antígeno aqui descritos. Em modalidades particulares, o ácido nucleico codifica uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80 % (por exemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idêntica ou que hibridiza sob condições de elevada estringência as SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 37, ou uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80 % (por exemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 %) idêntica ou que hibridiza sob condições de alta estringência, às SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36 ou SEQ ID NO: 38, ou combinações de 15 tais regiões variáveis pesadas e leves.

20

25 A presente invenção ainda fornece mamíferos transgênicos não humanos, hibridomas e plantas transgênicas que expressam e/ou produzem os anticorpos e porções de ligação a antígeno aqui descritas.

Igualmente fornecidos pela invenção são os kits contendo um ou mais anticorpos monoclonais isolados ou suas porções de ligação a antígeno aqui descritos e, opcionalmente, instruções para uso no tratamento ou no diagnóstico de uma doença associada com a sinalização dependente do

ErbB3, tais como os cânceres.

Os anticorpos e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção podem ser usados em uma ampla variedade de aplicações terapêuticas e diagnósticas, particularmente em aplicações oncológicas.

5 Consequentemente, em outro aspecto, a invenção provê um método para inibir a fosforilação de ErbB3 mediada pelo ligando semelhante a EGF em um paciente mediante administração de um ou mais anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno aqui descritos em uma quantidade suficiente para inibir a fosforilação de ErbB3 mediada semelhante a EGF. A invenção ainda provê  
10 métodos para tratar de uma variedade de cânceres em um paciente, incluindo, porém sem limitar, melanoma, câncer de mama, câncer ovariano, carcinoma renal, câncer gastrintestinal/do cólon, câncer pulmonar, sarcoma de células claras e câncer prostático, mediante administração de um ou mais anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno aqui descritos em uma quantidade suficiente para tratar do câncer. Os anticorpos ou suas porções de ligação a  
15 antígeno podem ser administrados isoladamente ou em combinação com outros agentes terapêuticos, tais como agentes anticâncer, por exemplo outros anticorpos, agentes quimioterápicos e/ou radiação.

Em ainda outras modalidades, a invenção fornece métodos para diagnosticar e prognosticar doenças (por exemplo, cânceres) associadas com ErbB3. Em uma modalidade, isto é obtido pelo contato dos anticorpos ou porções de ligação a antígenos da invenção (por exemplo *ex vivo* ou *in vivo*) com células do paciente, e medindo-se o nível de ligação ao ErbB3 nas células, em que níveis anormalmente elevados de ligação ao ErbB3 indicam  
25 que o paciente tem um câncer associado com ErbB3.

Outros aspectos e vantagens da invenção serão evidentes da seguinte descrição detalhada, e das reivindicações.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A e 1B são gráficos de barra descrevendo a

ligação de vários candidatos de anticorpos anti-ErbB3 (Fabs, aqui referidas como Abs) expressos nas células de melanoma MALME-3M com o uso de um anticorpo secundário Alexa 647 anti-humano de cabra.

As Figuras 2A a 2D são gráficos descrevendo os valores de  $K_D$  de vários candidatos de anticorpos anti-ErbB3. As Figuras 2A e 2B são gráficos descrevendo o valor de  $K_D$  do Anticorpo 6 (referido como Ab #6) e Anticorpo 3 (referido como Ab 3), respectivamente, quando medido com o uso de um ensaio de ligação celular com o uso de células de melanoma MALME-3M.

A Figura 3 é um gráfico descrevendo a especificidade de ligação de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) ao ErbB3 com o uso de ELISA, o EGFR, BSA e TGF- $\alpha$  tendo sido usados como controles.

A Figura 4 é um gráfico descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para reduzir os níveis totais de ErbB3 em células de melanoma MALME-3M *in vitro*, medidos com o uso de ELISA.

As Figuras 5A e 5B são gráficos descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para infrarregular os receptores de ErbB3 nas células MALME-3M, medida com o uso da análise FACS. A Figura 5A apresenta os resultados com o uso de um isótipo de IgG1 do anticorpo. A Figura 5B apresenta os resultados com o uso de um isótipo de IgG2 do anticorpo.

As Figuras 6A a 6D são gráficos descrevendo o decurso de tempo da infrarregulação do ErbB3 (Ab #6) mediada pelo anticorpo, medida com o uso da análise FACS.

A Figura 7 é um gráfico de barras descrevendo a capacidade de vários anticorpos anti-ErbB3 para infrarregular ErbB3 nas células de melanoma *in vivo*.

A Figura 8 é um gráfico de barras descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para infrarregular ErbB3 em

xenoenxertos *in vivo*.

A Figura 9 é um gráfico descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir a proliferação das células MALME-3M em um Ensaio Luminescente de Título Celular.

A Figura 10 é um gráfico descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir a proliferação celular em uma linhagem de células ovarianas, ADRr.

A Figura 11 é um gráfico descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir a proliferação das células ACHN.

A Figura 12 é um gráfico de barras descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir a fosforilação do ErbB3 em xenoenxertos ADRr *in vivo*.

As Figuras 13A a 13C são gráficos descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir a betacelulina e a fosforilação mediada pela herregulina do ErbB3 em células ADRr.

As Figuras 14A e 14B são gráficos descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Isótipo IgG2 Ab #6) para inibir a fosforilação de ErbB3 nas linhagens de células tumorais ovarianas OVCAR 5 e OVCAR 8.

As Figuras 15A a 15C são gráficos descrevendo a capacidade da betacelulina (BTC) para ligar ErbB1 como mostrado por uma falta de ligação às células MALME-3M negativas de ErbB3 (Figura 17A); ligação às células ADRr positivas de ErbB3 nas concentrações de 10 nM (Figura 17B) e de 200 nM (Figura 17B), respectivamente, e a inibição de tal ligação por Erbitux.

As Figuras 16A a 16B são gráficos descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Isótipo IgG2 Ab #6) para inibir a sinalização mediada pela herregulina nas células MALME-3M. A Figura 16A descreve a capacidade da Ab #6 para inibir a fosforilação mediada pela herregulina de ErbB3 em células MALME-3M, e a 16B descreve a capacidade da Ab #6 para

inibir a fosforilação de AKT as células MALME-3M.

As Figuras 17A a D são gráficos descrevendo a capacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inibir o crescimento de tumores (A) ovarianos (células ADRr), (B) prostáticos (células Du145), (C) ovarianos (células OvCAR8), e (D) pancreáticos (células Colo357) através de estudos de xenoenxertos.

As Figuras 18A e 18B são gráficos descrevendo a capacidade de Ab #6 (Figura 18A) e Fab para Ab 3 (Figura 18B) para inibir a ligação da herregulina ao ErbB3 nas células MALME-3M, medidos com o uso da análise FACS.

As Figuras 19A e 19B são gráficos descrevendo a capacidade de Ab #6 para inibir a ligação da epirregulina a ErbB3 nas células ADRr. A Figura 19A descreve a ligação da epirregulina às células ADRr, e a Figura 19B descreve a capacidade tanto de Erbitux quanto de Ab #6 para inibir a ligação da epirregulina às células ADRr.

As Figuras 20A e 20B são gráficos descrevendo a capacidade do fator de crescimento epidérmico de ligação da heparina (HB-EGF) para se ligar a ErbB nas células ADRr (Figura 20A) e a incapacidade de um anticorpo anti-ErbB3 (Ab #6) de inibir tal ligação (Figura 20B).

As Figuras 21A a 21C apresenta as sequências de aminoácidos das regiões de anticorpos variáveis de cadeia pesada e leve: Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 e Ab #19.

As Figuras 22A e 22B apresentam as sequências de nucleotídeos das regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos: Ab #6, Ab #3 e Ab #14.

A Figura 23 apresenta as sequências de aminoácidos das regiões variáveis de anticorpos de cadeia leve: Ab #6, Ab #17 e Ab #19, que foram revertidas para a sequência de aminoácidos da linha germinativa correspondente. As mudanças de resíduos de aminoácidos acham-se

sublinhadas.

As Figuras 24A a 24C são gráficos apresentando a capacidade de Ab #6 para inibir a secreção de VEGF das células tumorais.

5 A Figura 25 é um gráfico mostrando o efeito de Ab #6 sobre a migração celular.

As Figuras 26A a C são gráficos mostrando (A) a inibição do crescimento esferóide nas células AdrR, (B) a inibição do crescimento esferóide induzido por HRG em AdrR, e (C) a inibição do crescimento esferóide induzido por HRG em células Du145.

10 As Figuras 27A e B são gráficos mostrando o efeito de Ab #6 sobre (A) HRG e (B) ligação de BTC às células AdrR.

A Figura 28 é um gráfico mostrando o efeito de Ab #6 sobre a fosforilação de ErbB3 induzida por HGF.

15 As Figuras 29A e B mostram o efeito de Ab #6 sobre a fosforilação de (A) pErbB1 e pErbB3 e (B) a formação do complexo de ErbB2/3 induzido por HRG.

A Figura 30 é um gráfico mostrando os resíduos de aminoácidos 20 a 202 das ligações de Ab #6 de ErbB3.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 De modo a que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são primeiramente definidos. Definições adicionais são apresentadas na totalidade da descrição detalhada.

#### I. DEFINIÇÕES

25 Os termos “ErbB3,” “HER3,” “receptor de ErbB3” e “receptor de HER3” como aqui intercambiavelmente usados referem-se à proteína ErbB3 humana, como descrito na Patente U.S. nº 5.480.968 e em Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4905-4909 (1990); ver também Kani *et al.*, *Biochemistry* 44: 15842-15857 (2005), Cho e Leahy, *Science* 297: 1330-1333 (2002).

A expressão “ligando semelhante a EGF”, como aqui usada, refere-se a ligandos do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e proteínas intimamente relacionadas, tais como o fator- $\alpha$  de crescimento transformador (TGF- $\alpha$ ), betacelulina (BTC), fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF), birregulina (BIR) e anfirregulina (AR), que se ligam ao EGFR sobre a superfície das células e estimulam a atividade intrínseca da proteína-tirosina quinase do receptor. Especificamente, os ligandos semelhantes ao EGF induzem a formação de EGFR (também referida como ErbB1) e o complexo protéico de ErbB3 (ver, por exemplo, Kim *et al.*, (1998) *Biochem J.*, 334: 189-195), o que resulta na fosforilação dos resíduos de tirosina no complexo.

Os anticorpos e suas porções de ligação a antígeno da presente invenção inibem a fosforilação mediada pelo ligando semelhante a EGF do ErbB3 e, em certas formas de realização, apresentam uma ou mais das seguintes propriedades: (i) inibição de um ou mais dentre a sinalização mediada por herregulina, epirregulina, epigênio e birregulina (BIR) através de ErbB3; (ii) inibição da proliferação das células que expressam ErbB3; (iii) a capacidade para reduzir níveis de ErbB3 sobre as superfícies celulares; (iv) inibição da secreção de VEGF das células expressando ErbB3; (v) inibição da migração das células expressando ErbB3; (vi) inibição do crescimento esferóide das células expressando ErbB3; e/ou (vii) ligação a um epítopo localizado no domínio I do ErbB3, por exemplo um epítopo que envolve ou abrange os resíduos 20 a 202 da sequência de aminoácidos de ErbB3.

O termo “inibição”, como aqui usado, refere-se a qualquer redução estatisticamente significativa na atividade biológica, incluindo o bloqueio completo da atividade. Por exemplo, “inibição” pode referir-se a uma redução de cerca de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 % na atividade biológica.

Consequentemente, a expressão “inibição da fosforilação do

ErbB3 mediada pelo ligando semelhante a EGF”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno para reduzir de forma estatisticamente significativa a fosforilação do ErbB3 induzido por um ligando semelhante a EGF, em relação à fosforilação em uma célula não tratada (controle). A célula que expressa ErbB3 pode ser uma célula ou linhagem celular de ocorrência natural ou pode ser recombinantemente produzida pela introdução de ácido nucleico codificando ErbB3 em uma célula hospedeira. Em uma forma de realização, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo inibem a fosforilação do ErbB3 mediada pelo ligando semelhante ao EGF em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 % ou 100 %, quando determinado, por exemplo, por Western blotting, seguido por sondagem com um anticorpo antifosfotirosina, como descrito em Kim *et al.*, 15 (1998) *Biochem J.*, 334: 189-195 e os exemplos abaixo.

A expressão “inibição da herregulina, epirregulina, epigênio ou sinalização mediada pela birregulina através de ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou de uma porção que se liga ao antígeno do mesmo para estatisticamente de forma significativa reduzir a sinalização mediada por um ligando de ErbB3 (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio e birregulina) através do ErbB3, em relação à sinalização na ausência do anticorpo (controle). Os ligandos de ErbB3 são também aqui referidos como “ligandos semelhantes à herregulina”. Isto significa que, na presença do anticorpo ou de porção que se liga ao antígeno do mesmo, um sinal mediado em uma célula expressando ErbB3 por um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio e birregulina, em relação a um controle (sem anticorpo), é estatisticamente de forma significativa reduzido. Um sinal mediado pelo ligando ErbB3 pode ser medido pelo ensaio quanto ao nível ou atividade de um substrato de ErbB3, e/ou uma proteína que esteja

presente em uma cascata celular envolvendo ErbB3. Em uma forma de realização, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo reduz o nível ou atividade de um substrato de ErbB3 e/ou aquele de uma proteína em uma cascata celular envolvendo ErbB3, em pelo menos 10 %, ou pelo menos 5 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % em relação ao nível ou atividade na ausência de tal anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). Tal sinalização mediada pelo ligando de ErbB3 pode ser medida com o uso de técnicas 10 reconhecidas na prática que mede o nível ou atividade de um substrato de ErbB3 (por exemplo, SHC ou PI3K) ou uma proteína em uma cascata celular envolvendo ErbB3 (por exemplo, AKT) usando os ensaios de quinase para tais proteínas (ver, por exemplo, Horst *et al. supra*, Sudo *et al.* (2000) *Methods Enzymol.*, 322: 388-392; e Morgan *et al.* (1990) *Eur. J. Biochem.*, 15 191: 761-767).

Em uma forma de realização particular, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo inibe a sinalização mediada pelo ligando de ErbB3 (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio e birregulina) através de ErbB3 pela inibição da ligação do ligando de ErbB3 (por exemplo, um ou 20 mais dentre a herregulina, epirregulina, epigênio e birregulina) ao ErbB3. Alguns ligandos (por exemplo, a birregulina ou BIR) funcionam tanto como ligandos semelhantes a EGF (isto é, ligação ao EGFR/ErbB1), quanto como ligandos semelhantes ao ErbB3 (isto é, ligação ao ErbB3).

A expressão “inibição da ligação da herregulina, epirregulina, 25 epigênio ou birregulina ao ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo para, de forma estatisticamente significativa, reduzir a ligação de um ligando de ErbB3 (por exemplo um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) ao ErbB3, em relação à ligação na ausência do anticorpo

(controle). Isto significa que, na presença do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, a quantidade do ligando de ErbB3 (por exemplo herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) que se liga ao ErbB3 em relação a um controle (não anticorpo) é estatisticamente de forma significativa reduzida. A quantidade de um ligando de ErbB3 que liga o ErbB3 pode ser reduzida na presença de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da invenção em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % em 10 relação a quantidade na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). Uma redução na ligação do ligando de ErbB3 pode ser medida com o uso de técnicas reconhecidas na prática que medem o nível de ligação do ligando de ErbB3 rotulado (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina radiorrotulados) as células expressando 15 ErbB3 na presença ou na ausência (controle) do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo. na presença ou ausência (controle) do anticorpo ou de porção que se liga ao antígeno do mesmo.

A expressão “inibição da proliferação de uma célula expressando ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo de estatisticamente reduzir de forma significativa a proliferação de uma célula expressando ErbB3 em relação à proliferação na ausência do anticorpo. Em uma forma de realização, a proliferação de uma célula expressando ErbB3 (por exemplo, uma célula cancerosa) pode ser reduzida em pelo menos 10 %, 20 ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100%, quando as células são colocadas em contato 25 com o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da presente invenção, em relação à proliferação medida na ausência do anticorpo ou

porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). A proliferação celular pode ser ensaiada com o uso de técnicas reconhecidas na prática que medem o índice de divisão celular, a fração de células dentro de uma população celular que esteja sofrendo da divisão celular, e/ou o índice de perda celular de uma 5 população celular devida à diferenciação terminal ou morte celular (por exemplo, com o uso do ensaio luminescente de título celular ou incorporação da timidina).

A expressão “a capacidade de reduzir os níveis de ErbB3 sobre as superfícies celulares”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um 10 anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo para de forma significativa reduzir estatisticamente a quantidade de ErbB3 encontrada sobre a superfície de uma célula que tenha sido exposta ao anticorpo em relação a uma célula não tratada (controle). Por exemplo, uma redução nos níveis de ErbB3 sobre as superfícies celulares pode resultar da internalização 15 aumentada do ErbB3 (ou endocitose aumentada do ErbB3). Em uma forma de realização, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo reduz a expressão da superfície celular do ErbB3 em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 20 90 %, ou 100 % e/ou aumenta a internalização do receptor de ErbB3 em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % em relação à expressão da superfície celular ou internalização na ausência do anticorpo ou porção que se 25 liga ao antígeno do mesmo (controle). Os níveis de ErbB3 nas superfícies das células e/ou a internalização do receptor de ErbB3 na ausência e na presença de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo podem ser facilmente medidos com o uso de técnicas reconhecidas na prática, tais como aquelas descritas em Horst *et al.*,

acima e nos exemplos aqui apresentados.

A expressão “inibição da secreção de VEGF das células que expressam ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo para de forma significativa reduzir significativamente a secreção de VEGF de uma célula expressando ErbB3 em relação à secreção de VEGF na ausência do anticorpo. Em uma forma de realização, a secreção de VEGF de uma célula expressando ErbB3 (por exemplo, uma célula cancerosa) pode ser reduzida em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % quando as células se acham em contato com o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da presente invenção, em relação a secreção de VEGF medida na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). A secreção de VEGF pode ser ensaiada com o uso de técnicas reconhecidas na prática, tais como aquelas aqui descritas.

A expressão “inibição da migração de células expressando ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo para reduzir estatisticamente, de forma significativa, a migração de uma célula expressando ErbB3 em relação à migração da célula na ausência do anticorpo. Em uma forma de realização, a migração de uma célula expressando ErbB3 (por exemplo uma célula cancerosa) pode ser reduzida em pelo menos 10%, ou pelo menos 20%, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % quando as células se acham em contato com o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da presente invenção, em relação à migração celular medida na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). A migração celular pode ser ensaiada com o uso de

técnicas reconhecidas na prática, tais como aquelas aqui descritas.

A expressão “inibição do crescimento esferóide das células expressando ErbB3”, como aqui usada, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo para reduzir 5 estatisticamente de forma significativa a migração de uma célula expressando ErbB3 em relação à migração da célula na ausência do anticorpo. Em uma forma de realização, a migração de uma célula expressando ErbB3 (por exemplo, uma célula cancerosa) pode ser reduzida em pelo menos 10 %, ou pelo menos 20 %, ou pelo menos 30 %, ou pelo menos 40 %, ou pelo menos 10 50 %, ou pelo menos 60 %, ou pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, ou 100 % quando as células se acham em contato com o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da presente invenção, 15 em relação à migração celular medida na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo (controle). A migração celular pode ser ensaiada com o uso de técnicas reconhecidas na prática, tais como aquelas aqui descritas. Os termos “anticorpo” ou o termo “imunoglobulina”, como aqui intercambiavelmente usados, incluem anticorpos completos e qualquer fragmento de ligação a antígeno (isto é, “porção que se liga ao antígeno”) ou suas cadeias isoladas. Um “anticorpo” compreende pelo menos duas cadeias 20 pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada consiste de uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como  $V_H$ ) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada consiste de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve consiste de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada 25 como  $V_L$ ) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve consiste de um domínio, CL. As regiões  $V_H$  e  $V_L$  podem ser ainda subdivididas nas regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes da complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada  $V_H$  e  $V_L$  é

composto de três CDRs e quatro FRs, dispostos do término amino para o término carbóxi na seguinte ordem: FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos 5 podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complementar clássico. Anticorpos de exemplo da invenção incluem anticorpos #1, 3 e 14, e suas porções de ligação a antígeno.

10 A expressão “porção que se liga ao antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “porção de anticorpo”), como aqui usada, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que conserva a capacidade de especificamente ligar-se a um antígeno (por exemplo, ErbB3). Foi observado que a função da ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos 15 fragmentos de um anticorpo de comprimento completo. Exemplos de fragmentos de ligação incluídos dentro da expressão “porção que se liga ao antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fd 20 consistindo dos domínios  $V_H$  e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios  $V_L$  e  $V_H$  de um ramo único de um anticorpo, (v) um dAb incluindo os domínios VH e VL; (vi) um fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341, 544-546), que consiste de um domínio  $V_H$ ; (vii) um dAb que consiste de um domínio VH ou um VL; e (viii) uma região determinante da 25 complementaridade isolada (CDR) ou (ix) uma combinação de dois ou mais CDRs isolados que podem opcionalmente ser unidos por um ligador sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv,  $V_L$  e  $V_H$ , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, com o uso de métodos recombinantes, por um ligador sintético que possibilite que sejam

produzidos como uma cadeia de proteína única em que as regiões  $V_L$  e  $V_H$  pareiam para formar moléculas monovalentes [conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242, 423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883]. Pretende-se 5 que tais anticorpos de cadeia única sejam também incluídos dentro da expressão “porção que se liga ao antígeno” de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpos são obtidos com o uso de técnicas convencionais conhecidas daqueles com experiência na técnica, e os fragmentos são escolhidos quanto à utilidade da mesma maneira como o são os anticorpos intactos. As porções de 10 ligação a antígeno podem ser produzidas por técnicas recombinantes de DNA, ou por clivagem enzimática ou química das imunoglobulinas intactas.

A expressão “anticorpo monoclonal”, como aqui usada, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população 15 são idênticos, exceto quanto às mutações possíveis de ocorrência natural que possam estar presentes em quantidades secundárias. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um sítio antigênico único. Além disso, ao contrário das preparações convencionais (policlonais) de anticorpos que tipicamente incluem diferentes anticorpos 20 direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um determinante único sobre o antígeno. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados com o uso de qualquer técnica reconhecida na prática e aquelas aqui descritas tais como, por exemplo, um método de hibridoma, como descrito por Kohler *et al.* (1975) *Nature*, 256: 25 495, um animal transgênico como descrito, por exemplo, em Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859), métodos de DNA recombinantes (ver, por exemplo, a Patente U.S. nº 4.816.567), ou com o uso das bibliotecas de anticorpos de fato com o uso das técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*,

222: 581-597 (1991). Os anticorpos monoclonais incluem os anticorpos quiméricos, os anticorpos humanos e os anticorpos humanizados e podem ocorrer naturalmente ou ser recombinantemente produzidos.

A expressão “anticorpo recombinante” refere-se a anticorpos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que seja transgênico ou transcromossômicos quanto aos genes de imunoglobulina (por exemplo, genes de imunoglobulina humanos) ou um hibridoma deles preparados, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo de um transfecoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos combinatórios recombinantes (por exemplo, contendo sequências de anticorpos humanos) com o uso de apresentação de fago, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a união das sequências de genes de imunoglobulina (por exemplo, os genes da imunoglobulina humana), a outras sequências de DNA. Tais anticorpos recombinantes podem ter regiões variáveis ou constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas formas de realização, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos a mutagênese *in vitro* e, assim, as sequências de aminoácidos das regiões  $V_H$  e  $V_L$  dos anticorpos recombinantes são sequências que, enquanto derivadas e relacionadas às sequências  $V_H$  e  $V_L$ , podem não existir naturalmente dentro do repertório *in vivo* da linha germinativa de anticorpos humanos.

A expressão “imunoglobulina químérica” ou anticorpo refere-se a uma imunoglobulina ou anticorpo cujas regiões variáveis derivam de uma primeira espécie e cujas regiões constantes derivam de uma segunda espécie. Imunoglobulinas químéricas ou anticorpos podem ser construídos, por exemplo, por engenharia genética, dos segmentos de genes de imunoglobulina

pertencentes a diferentes espécies.

A expressão “anticorpo humano”, como aqui usada, pretende incluir anticorpos tendo regiões variáveis em que tanto as regiões de estrutura quanto de CDR são derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana como descrito, por exemplo, por Kabat *et al.* (Ver Kabat *et al.* (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH nº 91-3242). Além disso, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante também será derivada das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do sítio *in vitro*, ou por mutação somática *in vivo*). Entretanto, a expressão “anticorpo humano”, como aqui usada, não intenta incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamíferos, tais como um camundongo, tenham sido enxertadas nas sequências da estrutura humana.

O anticorpo humano pode ter pelo menos um ou mais aminoácidos substituídos por um resíduo de aminoácidos, por exemplo um resíduo de aminoácido intensificador da atividade, que não seja codificado pela sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana. Tipicamente, o anticorpo humano pode ter até vinte posições substituídas por resíduos de aminoácidos que não façam parte da sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em uma forma de realização particular, estas substituições se acham dentro das regiões de CDR como descrito em detalhes abaixo.

A expressão “imunoglobulina humanizada” ou “anticorpo humanizado” referem-se a uma imunoglobulina ou anticorpo que inclua pelo menos uma cadeia de imunoglobulina ou de anticorpos humanizados (isto é,

pelo menos uma cadeia humanizada leve ou pesada). As expressões “cadeia de imunoglobulina humanizada” ou “cadeia de anticorpos humanizados” (isto é, uma “cadeia leve de imunoglobulina humanizada” ou “cadeia pesada de imunoglobulina humanizada” refere-se a uma cadeia de imunoglobulina ou de anticorpo (isto é, uma cadeia leve ou pesada, respectivamente) tendo uma região variável que inclua uma região de estrutura variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humanos e regiões determinantes da complementaridade (CDRs) (por exemplo, pelo menos uma CDR, preferivelmente duas CDRs, mais preferível três CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humanos, e ainda inclua regiões constantes (por exemplo pelo menos uma região constante ou porção desta, no caso de uma cadeia leve, e preferivelmente três regiões constantes no caso de uma cadeia pesada). A expressão “região variável humanizada” (por exemplo, “região variável de cadeia leve humanizada” ou “região variável de cadeia pesada humanizada”) refere-se a uma região variável que inclui uma região de estrutura variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humanos, e regiões determinantes da complementaridade (CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humanos.

Um “anticorpo biespecífico ou bifuncional” é um anticorpo híbrido artificial tendo dois pares de cadeias pesadas/leves diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo a fusão de hibridomas ou a ligação de fragmentos Fab'. Ver, por exemplo, Songsivilai e Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79, 315-321; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148, 1547-1553. Em uma forma de realização particular, um anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção inclui sítios de ligação tanto para ErbB3 quanto para IGF1-R (isto é, receptor do fator 1 de crescimento semelhante à insulina). Em outra forma de realização, um anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção inclui sítios de ligação tanto para ErbB3 quanto para

C-MET. Em outras formas de realização, um anticorpo biespecífico inclui um sítio de ligação para ErbB3 e um sítio de ligação para ErbB2, ERbB3, ErbB4, EGFR, Lewis Y, MUC-1, EpCAM, CA125, antígeno da membrana específica da próstata, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , C-KIT, ou qualquer dos receptores de 5 FGF.

Como aqui usado, um “anticorpo heterólogo” é definido em relação ao organismo transgênico não humano ou planta que produzam um tal anticorpo.

Um “anticorpo isolado”, como aqui usado, refere-se a um 10 anticorpo que seja substancialmente livre de outros anticorpos que tenham especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se ligue ao ErbB3 é substancialmente livre de anticorpos que especificamente se ligue a antígenos outros que não o ErbB3). Além disso, um anticorpo isolado é típica e substancialmente livre de outro material 15 celular e/ou produtos químicos. Em uma forma de realização da invenção, uma combinação de anticorpos monoclonais “isolados” tendo diferentes especificidades de ligação a ErbB3 é combinada em uma composição bem definida.

Como aqui usado, “isótipo” refere-se à classe de anticorpos 20 (por exemplo IgM ou IgG1) que é codificada por genes de região constante de cadeia pesada. Em uma forma de realização, um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo é de um isótipo selecionado de um isótipo de anticorpo de IgG1, um de IgG2, um de IgG3, um de IgG4, um de IgM, um de IgA1, um de IgA2, um de IgAsec, um de IgD, ou um de IgE. Em algumas 25 formas de realização, um anticorpo monoclonal da invenção é do isótipo de IgG1. Em outras formas de realização, um anticorpo monoclonal da invenção é do isótipo de IgG2.

Como aqui usado, “mudança de isótipo” refere-se ao fenômeno pelo qual a classe, ou isótipo, de um anticorpo muda de uma classe

de Ig para uma das outras classes de Ig.

Como aqui usado, “isótipo não mudado” refere-se à classe isotípica de cadeia pesada que é produzida quando nenhuma mudança de isótipo tenha ocorrido; o gene CH codificado o isótipo não mudado é tipicamente o primeiro gene CH imediatamente a jusante do gene VDI funcionalmente reagrupado. A mudança de isótipo foi classificada como mudança de isótipo clássica e não clássica. A mudança clássica de isótipo ocorre por eventos de recombinação que envolve pelo menos uma região de sequência de mudança em um gene codificando um anticorpo. A mudança de isótipo não clássica pode ocorrer, por exemplo, pela recombinação homóloga entre  $\sigma_\mu$  humana e  $\Sigma_\mu$  humana (deleção  $\delta$ -associada). Mecanismos alternativos de mudança não clássica, tais como a recombinação intertransgênica e/ou intercromossômica, entre outras, podem ocorrer e efetuar a mudança isotípica.

Como aqui usada, a expressão “sequência de mudança” refere-se àquelas sequências de DNA responsáveis pela recombinação de mudança. Uma sequência “doadora de mudança”, tipicamente uma região de mudança  $\mu$ , será de 5’ (isto é, a montante) da região de construção a ser deletada durante a recombinação de mudança. A região “aceptora de mudança” se situará entre a região de construção a ser deletada e a região constante de substituição (por exemplo,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  etc.). Como não existe nenhum sítio específico em que a recombinação sempre ocorra, a sequência de genes final tipicamente não será predizível da construção.

Um “antígeno” é uma entidade (por exemplo, uma entidade ou peptídeo proteináceos) à qual um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo se ligam. Em várias formas de realização da presente invenção, um antígeno é ErbB3 ou uma molécula semelhante a ErbB3. Em uma forma de realização particular de acordo com a invenção, um antígeno é um ErbB3 humano.

Os termos “epítopo” ou “determinante antigênico” refere-se a

um sítio ou um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo especificamente se liga. Os epítopos podem ser formados tanto dos aminoácidos contíguos quando dos aminoácidos não contíguos justapostos pela duplicação de uma proteína. Os epítopos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos na exposição a solventes de desnaturação, ao passo que os epítopos formados pela duplicação terciária são 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 única conformação espacial. Métodos de determinar a conformação espacial dos epítopos incluem as técnicas na prática, e aqueles aqui descritos, por exemplo a cristalografia de raio-X e a ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Volume 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Igualmente abrangidos pela presente invenção são os anticorpos que ligam o mesmo epítopo ou um epítopo de sobreposição como os anticorpos da presente invenção, isto é, anticorpos que competem para ligação ao ErbB3, ou ligam epítopos que se sobrepõem com os epítopos ligados pelos anticorpos aqui descritos, isto é, um epítopo localizado no domínio I do ErbB3. Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser identificados com o uso de técnicas de rotina, tais como um imunoensaio, por exemplo pela apresentação da capacidade de um anticorpo bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno alvo, isto é, um ensaio de ligação competitiva. A ligação competitiva é determinada em um ensaio em que a imunoglobulina sob teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como o ErbB3. Numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo o radioimunoensaio (RIA) direto ou indireto, o imunoensaio enzimático (EIA) de fase sólida direto ou indireto, o ensaio de competição de sanduíche [ver

Stahli *et al.*, (1983) *Methods in Enzymology* 9: 242); o EIA de biotina-avidina direto de fase sólida (ver Kirkland *et al.*, (1986) *J. Immunol.* 137: 3614); o ensaio rotulado direto de fase sólida, o ensaio de sanduíche rotulado de fase sólida [ver Harlow e Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press]; o RIA de rótulo direto de fase sólida com o uso do rótulo I-125 [ver Morel *et al.*, (1988) *Mol. Immunol.* 25(1): 7]; o EIA de biotina-avidina direto de fase sólida [Cheung *et al.*, (1990) *Virology* 176: 546]; e o RIA rotulado direto [Moldenhauer *et al.*, (1990) *Scand. J. Immunol.* 32: 77]. Tipicamente, um tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado (por exemplo, ErbB3) ligado a uma superfície sólida ou células carregando qualquer destes, uma imunoglobulina de teste não rotulada e uma imunoglobulina de referência rotulada. A inibição competitiva é medida pela determinação da quantidade de rótulo ligado à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Usualmente a imunoglobulina de teste se acha presente em excesso. Usualmente, quando um anticorpo de competição esteja presente em excesso, ele inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50 a 55 %, 55 a 60 %, 60 a 65 %, 65 a 70 % 70 a 75 % ou mais.

Como aqui usadas, as expressões “ligação específica”, “especificamente liga”, “ligação seletiva” e “seletivamente liga” significam que um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, apresentam afinidade apreciável por um antígeno ou epítopo particulares e, geralmente, não apresenta reatividade cruzada significativa com outros抗ígenos e epítulos. Ligação “apreciável” ou preferida inclui a ligação com uma afinidade de pelo menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M<sup>-1</sup> ou  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. As afinidades maiores do que  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferivelmente maiores do que  $10^8$  M<sup>-1</sup>, são mais preferidas. Os valores intermediários daqueles aqui apresentados são também considerados dentro do escopo da presente invenção, e uma afinidade de ligação preferida pode ser indicada como uma faixa de afinidades, por

exemplo  $10^6$  a  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, preferivelmente  $10^7$  a  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, mais preferível  $10^8$  a 5  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Um anticorpo que “não apresenta reatividade cruzada significativa” é aquele que não se ligará apreciavelmente a uma entidade indesejável (por exemplo, uma entidade proteinácea indesejável). Por exemplo, e uma modalidade, um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo que 10 especificamente se ligue a ErbB3 se ligará apreciavelmente a essa molécula de ErbB3, mas não reagirá significativamente com outras moléculas de ErbB e proteínas ou peptídeos de ErbB. A ligação específica ou seletiva pode ser determinada de acordo com qualquer dispositivo reconhecido na técnica para determinar tal ligação, incluindo, por exemplo, de acordo com Scatchard, análise e/ou ensaios competitivos de ligação.

O termo “K<sub>D</sub>”, como aqui usado, refere-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação particular de抗ígenos de anticorpos ou a afinidade de um anticorpo por um antígeno. Em uma forma de realização, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo de acordo com a presente invenção se liga a um antígeno (por exemplo, ErbB3) com 15 uma afinidade (K<sub>D</sub>) de 50 nM ou melhor (isto é, ou menos) (por exemplo, 40 nM ou 30 nM ou 20 nM ou 10 nM ou menos), conforme medido com o uso de um ensaio superficial de ressonância de plásmon ou um ensaio de ligação celular. Em uma forma de realização particular, um anticorpo ou porção que 20 se liga ao antígeno do mesmo de acordo com a presente invenção se liga a ErbB3 com uma afinidade (K<sub>D</sub>) de 8 nM ou melhor (por exemplo, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1,4 nM, 1,3 nM, 1 nM ou menos), medida por um ensaio superficial de ressonância de plásmon ou um ensaio de ligação 25 celular. Em outras formas de realização, um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo se liga a um antígeno (por exemplo, ErbB3) com uma afinidade (K<sub>D</sub>) de aproximadamente menos do que 10<sup>-7</sup> M, tal como de aproximadamente menos do que 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M ou 10<sup>-10</sup> M ou ainda menos quando determinada pela tecnologia de ressonância superficial de plásmon

(SPR) em um instrumento BIACORE 3000 com o uso de ErbB3 recombinante como o analito e o anticorpo como o ligando, e se liga ao antígeno predeterminado com uma afinidade que seja pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade pela ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) outro que não o antígeno predeterminado ou um antígeno intimamente relacionado.

O termo “ $K_{off}$ ”, como aqui usado, intenta referir-se à constante de dissociação para a dissociação de um anticorpo do complexo de anticorpo/antígeno.

O termo “EC50”, como aqui usado, refere-se à concentração de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo, que induz uma resposta, ou em um ensaio *in vitro* ou *in vivo*, que seja 50 % da resposta máxima, isto é, equidistante entre a resposta máxima e a linha de referência.

Como aqui usado, “padrão de glicosilação” é definido como o padrão de unidades de carboidratos que sejam covalentemente ligadas a uma proteína, mais especificamente a uma proteína de imunoglobulina.

A expressão “de ocorrência natural”, como aqui usada conforme aplicada a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeos ou de polinucleotídeos que esteja presente em um organismo (incluindo vírus) que possa ser isolado de uma fonte na natureza e que não tenha sido intencionalmente modificado pelo homem no laboratório, é de ocorrência natural.

O termo “reagrupado”, como aqui usado, refere-se a uma configuração de um lócus de imunoglobulina de cadeia pesada ou de cadeia leve, em que um segmento V é posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou J em uma conformação codificando essencialmente um domínio  $V_H$  ou  $V_L$  completo, respectivamente, um lócus de genes de imunoglobulina reagrupado pode ser identificado por comparação com o

DNA da linha germinativa; um lócus reagrupado terá pelo menos um elemento de homologia de heptâmero/nonâmero recombinado.

As expressões “não reagrupado” ou “configuração da linha germinativa”, como aqui usadas, com referência a um segmento V, refere-se à configuração em que o segmento V não é recombinado de modo a ser imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

A expressão “molécula de ácido nucleico”, como aqui usada, incluem moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento único ou de filamento duplo, mas preferivelmente é DNA de filamento duplo.

A expressão “molécula de ácido nucleico isolada”, como aqui usada com referência a ácidos nucleicos codificando anticorpos ou porções de anticorpos (por exemplo,  $V_H$ ,  $V_L$ , CDR3) que se ligam a ErbB3, refere-se a uma molécula de ácido nucleico em que as sequências de nucleotídeos codificando o anticorpo ou a porção de anticorpos são livres de outras sequências de nucleotídeos codificando anticorpos que ligam抗ígenos outros que não ErbB3, cujas outras sequências podem flanquear naturalmente o ácido nucleico no DNA genômico humano.

Os termos “modificar” ou “modificação”, como aqui usados, referem-se à mudança de um ou mais aminoácidos nos anticorpos ou suas porções de ligação a抗ígeno. A mudança pode ser produzida com o uso de técnicas conhecidas, tais como a mutagênese de PCR. Por exemplo, em algumas formas de realização, um anticorpo ou suas porções de ligação a抗ígeno identificados com o uso dos métodos da invenção, podem ser modificados, para por esse meio modificar a afinidade de ligação do anticorpo ou suas porções de ligação a抗ígeno ao ErbB3.

A presente invenção também inclui “substituições conservativas de aminoácidos” nas sequências dos anticorpos da invenção, isto é, modificações de sequências de nucleotídeos e aminoácidos que não

anulam a ligação do anticorpo codificado pela sequência de nucleotídeos ou contendo a sequência de aminoácidos, ao antígeno, isto é, ao ErbB3. As substituições conservativas de aminoácidos incluem a substituição de um aminoácido em uma classe por um aminoácido da mesma classe, em que uma classe é definida pelas propriedades comuns fisicoquímicas da cadeia lateral de aminoácidos e pelas frequências de altas substituições nas proteínas homólogas encontradas na natureza, conforme determinado, por exemplo, por uma matriz de troca de frequência de Dayhoff padrão ou matriz BLOSUM. Seis classes gerais de cadeias laterais de aminoácido foram categorizadas e incluem: Classe I (Cys); Classe II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Classe III (Asn, Asp, Gln, Glu); Classe IV (His, Arg, Lys); Classe V (Ile, Leu, Val, Met); e Classe VI (Phe, Tyr, Trp). Por exemplo, a substituição de outra classe de resíduo de classe III por Asp, tal como Asn, Gln ou Glu, é uma substituição conservativa. Assim, um resíduo de aminoácido não essencial previsto em um anticorpo anti-ErbB3 é preferivelmente substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma classe. Métodos de identificar nucleotídeos e substituições conservativas de aminoácidos que não eliminam a ligação a antígeno são bem conhecidos na técnica [ver, por exemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); e Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)].

A expressão “substituição de aminoácidos não conservativa” refere-se à substituição de um aminoácido em uma classe com um aminoácido de outra classe; por exemplo, a substituição de uma Ala, um resíduo de classe II, por um resíduo de classe III tal como Asp, Asn, Glu ou Gln.

Alternativamente, em outra forma de realização, mutações (conservativas ou não conservativas) podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou de parte de uma sequência que codifique o anticorpo anti-ErbB3, tal como por mutagênese de saturação, e os anticorpos anti-ErbB3 modificados resultantes podem ser testados quanto à atividade de ligação.

Uma “sequência de consenso” é uma sequência formada de aminoácidos (ou nucleotídeos) de ocorrência mais frequente em uma família de sequências relacionadas (Ver, por exemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha 1987). Em uma família de proteínas, cada posição na sequência de consenso é ocupada pelo aminoácido de ocorrência mais frequente naquela posição na família. Se dois aminoácidos ocorrem com igual frequência, qualquer um pode ser incluído na sequência de consenso. Uma “estrutura de consenso” de uma imunoglobulina refere-se a uma região de estrutura na sequência de consenso de imunoglobulina.

De forma semelhante, a sequência de consenso para os CDRs pode ser derivada por alinhamento ótimo das sequências de aminoácidos de CDR dos anticorpos de ErbB3 da presente invenção.

Quanto aos ácidos nucleicos, a expressão “homologia substancial” indica que dois ácidos nucleicos, ou suas sequências atribuídas, quando otimamente alinhados e comparados, são idênticos, com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas, em pelo menos cerca de 80 % dos nucleotídeos, usualmente pelo menos cerca de 90 % a 95 %, e mais preferível pelo menos cerca de 98 % a 99,5 % dos nucleotídeos. Alternativamente, a substancial homologia existe quando os segmentos venham a hibridizar sob condições de hibridização seletiva, ao complemento do filamento.

O percentual de identidade entre duas sequência é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de homologia =  $n^o$  de posições idênticas/ $n^o$  total de posições x 100), levando em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que necessitam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação das sequências e a determinação do percentual de identidade entre duas sequências podem ser realizadas com o uso de um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não limitativos abaixo.

O percentual de identidade entre duas sequências de

nucleotídeos pode ser determinado com o uso do programa GAP no software GCG, usando a matriz NWSgapdna.CMP e um peso de intervalo de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. O percentual de identidade entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos pode 5 também ser determinado com o uso do algoritmo de E. Meyers e W. Miller [CABIOS, 4: 11-17 (1989)] que tenha sido incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), com o uso de uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, o percentual de identidade entre duas sequências de 10 aminoácidos pode ser determinado com o uso do algoritmo de Needleman e Wunsch [J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)] que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG, com o uso ou de uma matriz Blossum 62 ou de uma matriz PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

15 As sequências de ácido nucleico e de proteínas da presente invenção podem ainda ser usadas como uma “sequência de interrogação” para realizar uma busca contra bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Tais buscas podem ser realizadas com o uso dos programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul *et al.* 20 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. As buscas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, classificação = 100, comprimento de palavra = 12 para se obter sequências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucleico da invenção. As buscas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, classificação 50, 25 comprimento da palavra = 3 para se obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína da invenção. Para se obter alinhamentos afastados para fins de comparação. O BLAST afastado pode ser utilizado como descrito em Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Quando da utilização dos programas BLAST e BLAST Afastado, os

parâmetros padrão dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados.

Os ácidos nucleicos podem estar presentes nas células completas, em um lisado celular, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “tornado substancialmente puro” quando purificado fora de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, mediante técnicas padrão, incluindo o tratamento alcalino/SDS, bandeamento de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outras bem conhecidas na técnica. Ver F. Ausubel *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

As composições de ácido nucleico da presente invenção, embora frequentemente em uma sequência nativa (exceto quanto aos sítios de restrição modificados e outros) de qualquer cDNA, suas misturas genômicas podem ser transformadas, de acordo com técnicas padrão para prover sequências de genes. Quanto às sequências codificadoras, estas mutações podem afetar a sequência de aminoácidos conforme desejado. Em particular, as sequências de DNA substancialmente homólogas ou derivadas das sequências nativas V, D, J, constantes, de mudanças e outras aqui descritas, são consideradas (onde “derivadas” indica que uma sequência é idêntica ou modificada de outra sequência).

A expressão “operavelmente ligada” refere-se a uma sequência de ácido nucleico colocada em um relacionamento funcional com outra sequência de aminoácidos. Por exemplo, DNA para uma pré-sequência ou condutora secretora é operavelmente ligado a DNA para um polipeptídeo se ele for expresso como uma pré-proteína que participe na secreção do polipeptídeo; um promotor ou intensificador é operavelmente ligado a uma sequência codificadora se ele afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de

ligação ribossômica é operavelmente ligado a uma sequência codificadora se ele for posicionado de modo a facilitar a translação. Em geral, “operavelmente ligado” significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas, e, no caso de uma condutora secretora, contígua e na fase de leitura. Entretanto, os intensificadores não têm de ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, ao adaptadores ou ligadores de oligonucleotídeos sintéticos são usados de acordo com a prática comercial. Um ácido nucleico é “operavelmente ligado” quando ele é colocado em um relacionamento funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor ou intensificador é operavelmente ligado a uma sequência codificadora se ele afetar a transcrição da sequência. Com relação às sequências reguladoras da transcrição, operavelmente ligado significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas e, quando necessário unir duas regiões codificadoras da proteína, contíguas e na matriz de leitura. Para sequências de mudança, operavelmente ligado indica que as sequências são capazes de efetuar recombinação de mudança.

O termo “vetor”, como aqui usado, intenta referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ela tenha sido ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo” que se refere a um circuito de DNA circular de filamento duplo em que os segmentos adicionais de DNA podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral em que os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores epissômicos de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não epissômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira, e por esse meio são replicados junto com o genoma hospedeiro.

Além disso, certos vetores são capazes de dirigir a expressão dos genes aos quais eles são operavelmente ligados. Tais vetores são aqui referidos como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente “vetores de expressão”). Em geral, os vetores de expressão de utilidade nas técnicas de 5 DNA recombinantes são frequentemente na forma de plasmídeos. Os termos “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados intercambiavelmente. Entretanto, a invenção inclui essas outras formas de vetores de expressão, tais como os vetores virais (por exemplo, retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados de replicação defeituosos), os quais servem funções equivalentes.

10 A expressão “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), como aqui usada, refere-se a uma célula em que um vetor de expressão recombinante tenha sido introduzido. Deve ficar entendido que tais expressões pretendem referir-se não apenas à célula objeto particular, mas à progênie de uma tal célula. Tendo em vista que certas 15 modificações podem ocorrer em gerações sucessivas por causa das influências ou da mutação ou ambientais, tal progênie não podendo, de fato, ser idêntica à célula precursora, mas ainda sendo incluída dentro do escopo da expressão “célula hospedeira”, como aqui usada. Os termos “tratar”, “tratando” e “tratamento”, como aqui usados, referem-se às medidas terapêuticas ou 20 preventivas descritas neste relatório. Os métodos de “tratamento” empregam a administração a um paciente, de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno da presente invenção, por exemplo um paciente tendo uma doença ou distúrbio associados com a sinalização dependente do ErbB3 ou predisposto a ter uma tal doença ou distúrbio, de modo a prevenir, curar, 25 retardar, reduzir, a gravidade ou melhorar um ou mais sintomas, da doença ou distúrbio, ou da doença ou distúrbio recorrentes, ou de modo a prolongar a sobrevivência do paciente além daquela esperada na ausência de tal tratamento.

As expressões “doença associada com a sinalização

dependente do ErbB3” ou “distúrbio associado com a sinalização dependente do ErbB3”, como aqui usadas, incluem os estados de doença e/ou sintomas associados com o estado de doença, em que os níveis aumentados de ErbB3 e/ou ativação das cascatas celulares envolvendo ErbB3 são observados.

5 Entende-se que o ErbB3 heterodimeriza com outras proteínas de ErbB, tais como EGFR e ErbB2, quando níveis aumentados de ErbB3 são observados. Consequentemente, a expressão “doença associada com a sinalização dependente do ErbB3” também inclui estados de doença e/ou sintomas associados com os estados de doença, em que níveis aumentados de heterodímeros de EGFR/ErbB3 e/ou ErbB2/ErbB3 são observados. Em geral, 10 a expressão “doença associada com a sinalização dependente do ErbB3” refere-se a qualquer distúrbio, o começo, a progressão ou a persistência dos sintomas dos quais se necessita a participação do ErbB3. Distúrbios de exemplo mediados pelo ErbB3 incluem, porém sem limitar, por exemplo, o 15 câncer.

Os termos “câncer” e “cancerosos” referem-se ou descrevem a condição fisiológica nos mamíferos, que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, sem limitar, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais 20 particulares de tais cânceres incluem o câncer de células escamosas, o câncer pulmonar de células pequenas, o câncer pulmonar de células não pequenas, o câncer gástrico, câncer pancreático, tumores de células gliais tais como o glioblastoma e a neurofibromatose, o câncer cervical, câncer ovariano, câncer do fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mamas, câncer do cólon, 25 melanoma, câncer colorretal, carcinoma endométrico, carcinoma das glândulas salivares, câncer dos rins, câncer renal, câncer da próstata, câncer vulvar, câncer da tireóide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer da cabeça e do pescoço. Em uma forma de realização particular, um câncer tratado ou diagnosticado com o uso dos métodos da presente invenção é

selecionado dentre melanoma, câncer de mamas, câncer ovariano, carcinoma renal, câncer gastrintestinal/colônico, câncer dos pulmões e câncer da próstata.

A expressão “quantidade eficaz”, como aqui usada, refere-se àquela quantidade de um anticorpo ou uma porção que se liga ao antígeno do mesmo que se liga ao ErbB3, que seja suficiente para efetuar o tratamento, o prognóstico ou o diagnóstico de uma doença associada com a sinalização dependente do ErbB3, como aqui descrito, quando administrada a um paciente. Uma quantidade terapeuticamente eficaz variará na dependência do paciente e da condição de doença que esteja sendo tratada, do peso e da idade do paciente, da gravidade da condição de doença, da forma de administração, etc., que possa ser facilmente determinada por uma pessoa de experiência comum na técnica. As dosagens para administração podem variar, por exemplo, de cerca de 1 ng a cerca de 10.000 mg, de cerca de 5 ng a cerca de 9.500 mg, de cerca de 10 ng a cerca de 9.000 mg, de cerca de 20 ng a cerca de 8.500 mg, de cerca de 30 ng a cerca de 7.500 mg, de cerca de 40 ng a cerca de 7.000 mg, de cerca de 50 ng a cerca de 6.500 mg, de cerca de 100 ng a cerca de 6.000 mg, de cerca de 200 ng a cerca de 5.500 mg, de cerca de 300 ng a cerca de 5.000 mg, de cerca de 400 ng a cerca de 4.500 mg, de cerca de 500 ng a cerca de 4.000 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 3.500 mg, de cerca de 5 µg a cerca de 3.000 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 2.600 mg, de cerca de 20 µg a cerca de 2.575 mg, de cerca de 30 µg a cerca de 2.550 mg, de cerca de 40 µg a cerca de 2.500 mg, de cerca de 50 µg a cerca de 2.475 mg, de cerca de 100 µg a cerca de 2.450 mg, de cerca de 200 µg a cerca de 2.425 mg, de cerca de 300 µg a cerca de 2.000, de cerca de 400 µg a cerca de 1.175 mg, de cerca de 500 µg a cerca de 1.150 mg, de cerca de 0.5 mg a cerca de 1.125 mg, de cerca de 1 mg a cerca de 1.100 mg, de cerca de 1,25 mg a cerca de 1.075 mg, de cerca de 1,5 mg a cerca de 1.050 mg, de cerca de 2,0 mg a cerca de 1.025 mg, de cerca de 2,5 mg a cerca de 1.000 mg, de cerca de 3,0 mg a

cerca de 975 mg, de cerca de 3,5 mg a cerca de 950 mg, de cerca de 4,0 mg a cerca de 925 mg, de cerca de 4,5 mg a cerca de 900 mg, de cerca de 5 mg a cerca de 875 mg, de cerca de 10 mg a cerca de 850 mg, de cerca de 20 mg a cerca de 825 mg, de cerca de 30 mg a cerca de 800 mg, de cerca de 40 mg a cerca de 775 mg, de cerca de 50 mg a cerca de 750 mg, de cerca de 100 mg a cerca de 725 mg, de cerca de 200 mg a cerca de 700 mg, de cerca de 300 mg a cerca de 675 mg, de cerca de 400 mg a cerca de 650 mg, de cerca de 500 mg, ou de cerca de 525 mg a cerca de 625 mg, de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, de acordo com a invenção. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para prover a resposta terapêutica ótima. Uma quantidade eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais (isto é, efeitos colaterais) de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo são minimizados e/ou excedidos pelos efeitos benéficos.

15 O termo “paciente” inclui pacientes humanos e outros pacientes mamíferos que recebam tratamento profilático ou terapêutico.

Como aqui usado, o termo “indivíduo” inclui qualquer animal humano ou animal não humano. Por exemplo, os métodos e composições da presente invenção podem ser usados para tratar de um indivíduo que tenha câncer. Em uma forma de realização particular, o indivíduo é um ser humano. A expressão “animal não humano” inclui todos os vertebrados, por exemplos mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, carneiros, cães, vacas, galinhas, anfíbios, répteis etc.

25 O termo “amostra” refere-se a tecido, fluido corporal, ou uma célula de um paciente ou um indivíduo. Normalmente, o tecido ou célula será removido do paciente, mas o diagnóstico *in vivo* é também considerado. No caso de um tumor sólido, uma amostra de tecido pode ser colhida de um tumor cirurgicamente removido e preparada para teste mediante técnicas convencionais.x No caso de linfomas e leucemias, os linfócitos, as células

leucêmicas, ou tecidos linfáticos podem ser obtidos e apropriadamente preparados. Outras amostras do paciente, incluindo urina, gotas de lágrimas, soro, fluido cerebroespinhal, fezes, esputo, extratos celulares etc. pode também ser úteis para tumores específicos. As expressões “agente anticâncer” e “agente antineoplástico” referem-se a medicamentos usados para tratar de malignidades, tais como os crescimentos cancerosos. A terapia medicamentosa pode ser usada isoladamente, ou em combinação com outros tratamentos, tais como cirurgia ou terapia de radiação. Várias classes de medicamentos podem ser usadas no tratamento do câncer, dependendo da natureza do órgão envolvido. Por exemplo, os cânceres de mamas são comumente estimulados pelos estrogênios, e podem ser tratados com medicamentos que inativem os hormônios sexuais. De forma semelhante, o câncer prostático pode ser tratado com medicamentos que inativam os androgênios, o hormônio sexual masculino. Os agentes anticâncer da presente invenção incluem, entre outros, os seguintes agentes:

<b>Agente Anticâncer</b>	<b>Comentários</b>	<b>Exemplos</b>
Anticorpos	Anticorpos que ligam	A12 (mAb completamente
(a) anticorpos outros que	IGF-1R (receptor do tipo 1 humanizado)	
não os anticorpos anti-	do fator de crescimento	CP751-871 (mAb completa-
ErbB3; e	semelhante à insulina) que	mente humanizado)
(b) anticorpos anti-ErbB3	é expresso na superfície	H7C10 (mAb humanizado)
que ligam diferentes epíto-	celular da maioria dos	alfaIR3 (camundongo)
pos	cânceres humanos	scFV/FC (quimera de ca-
		mundongo/humana)
		EM/164 (camundongo)
	Anticorpos que ligam	Matuzumab (EMD72000)
	EGFR (receptor do fator	Erbitux®/Cetuximab(Imclone)
		de crescimento epidérmico);
	Mutações que afetam	

Vectibix®/Panitumumab	
a expressão ou atividade	(Amgen)
de EGFR podem resultar	mAb 806
em câncer	Nimotuzumab (TheraCIM)
<hr/>	
Anticorpos que ligam	AVEO (AV299) (AVEO)
cMET (fator de trans-	AMG102 (Amgen)
sição epitelial mesen-	5D5 (AO-5D5) (Genentech)
quimatoso); um mem-	
bro da família MET das	
tirosina quinases do re-	
ceptor)	
Anticorpos Anti-ErbB3	
que ligam diferentes	
epítopos	Ab #14 (MM 121-14) aqui
Moléculas Pequenas	
Alvejando IGF1R	
IGF-1R (receptor do tipo	descrito
1 do fator de crescimento	Herceptin® (Trastuzumab;
semelhante à insulina), que	Genentech)
é expresso na superfície	1B4C3; 2D1D12 (U3
celular de maioria dos cân-	Pharma AG)
ceres humanos	NVP-AEW541-A
	BMS-536.924 (1H-benzo-
	imidazol-1-il)-1H-piridin-
	2-ona)
	BMS-554.417
	Cicloligan
	TAE226
	PQ401
Moléculas Pequenas	
EGFR (receptor do fator	Iressa®/Gefitinib

Alvejando EGFR	de crescimento epidérmico). Mutações que afetam a expressão ou a atividade de EGFR podem resultar em câncer	(AstraZeneca) CI-1033 (PD 183805)Pfizer Lapatinib (GW-572016) GlaxoSmithKline) Tykerb®/Lapatinib Ditosilato (SmithKline Beecham) Tarceva®/Erlotinib HCL (OSI-774) (OSI Pharma) PKI-166 (Novartis) PD-158780 EKB-569 Tyrphostin AG 1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina
Moléculas Pequenas	cMET (fator de transição epitelial mesenquimatoso), um membro da família MET	PHA665752
Alvejando cMET	das tirosinas quinases do receptor	ARQ 197
Antimetabólitos	Um antimetabólito é um produto químico com uma estrutura semelhante a uma substância (um metabólito) 5-trifluorometil-2'-desoxi-necessário para as reações bioquímicas normais, embora diferentes o bastante para interferir com as funções normais	Fluorouracila (5-FU) Capecitabina / XELODA® (HLR Roche) uridina Metotrexato sódico(Trexall) (Barr) Raltitrexed/Tomudex® (AstraZaneca)

	das células, incluindo a divisão celular	Pemetrexed / Alimta®(Lilly) Tegafur Citosina Arabinoside (Cytarabine, Ara-C) / Thioguanine® (GlaxoSmithKline) 5-azacitidina 6-mercaptopurina (Mercaptopurina, 6-MP) Azatioprina / Azasan® (AAIPHARMALLC) 6-tioguanina (6-TG) / Purinethol® (TEVA) Pentostatina / Nipent® (Hospira Inc.) Fludarabina fosfato / Fludara® (Bayer Health Care) Cladribina (2-CdA, 2-cloro- desoxiadenosina) / Leustatin® (Ortho Biotech)
Agentes de alquilação	Um agente antineoplás- tico de alquilação é um agente de alquilação que liga um grupo alquila ao DNA. Tendo em vista que as células de câncer em geral prolifetam irrestrita- mente mais do que o fa-	Inibidor da Ribonucleotídeo Redutase (RNR) Ciclofosfamida/Citoxan (BMS) Neosar (TEVA) Ifosfamida/Mitoxana® (ASTA Medica) Thiotepa (Bedford, Abraxis,

	zem as células saudáveis, Teva) elas são mais sensíveis ao BCNU→ 1,3-bis(2-cloro-dano do DNA, e os agentes etil)-1-nitrosouréia de alquilação são usados CCNU→ 1-(2-cloroetil)-3-clinicamente para tratar de cicloexil-1-nitrosouréia uma variedade de tumores. (metil CCNU)	
		Hexametilmelamina
		Altretamina, HMM) /
	Inibidor da Ribonucleot	Hexalen® (MGI Pharma Inc)
		Busulfan / Myleran (Glaxo- SmithKline)
		Procarbazina HCL) /
		Matulane (Sigma Tau Phar- maceuticals, Inc.)
		Dacarbazina (DTIC)
		Clorambucil / Leukaran® (SmithKline Beecham)
		Melphalan / Alkeran® (GlaxoSmithKline)
		Cisplatin (Cisplatinum, CDDP) / Platinol (Bristol Myers)
		Carboplatina / Paraplatina (BMS)
		Oxaliplatina / Etoxitán® (Sanofi-Aventis US)
Inibidores da Topoisomerase	Os inibidores da topo-isomerase são agentes	Doxorrubicina HCL/Doxil® (Alza)

	de quimioterapia destinados a interferir com a ação das enzimas topoisomerase (topoisomerase I e II), que são enzimas que controlam as mudanças na estrutura do DNA por catalisação do rompimento e reunião da estrutura de fosfodiéster dos filamentos de DNA durante o ciclo celular normal.	Daunorubicin citrato / Daunoxome® (Gilead) Mitoxantrone HCL/ Novantrone (EMD Serono) Actinomicina D Etoposide / Vepesid® (BMS / Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, etc.) Topotecan HCL/ Hycamtin® (GlaxoSmithKline) Teniposide (VM-26) / Vumon® (BMS) Irinotecan HCL (CPT-11) / Camptosar® (Pharmacia & Upjohn)
Agentes de alvejamento de microtúbulos	Microtúbulos são um dos componentes do citosqueleto. Eles têm diâmetro de ~24 nm e comprimento que varia de vários micrômetros a possivelmente milímetros em axônios de células nervosas. Os microtúbulos servem como componentes estruturais dentro das células e se acham	Vincristina / Oncovin® (Lilly) Vinblastina sulfato/Velban® (descontinuado) (Lilly) Vinorelbina/tartarato/ Navelbine® (PierreFabre) Vindelsina sulfato/Eldisine® (Lilly) Paclitaxel / Taxol® (BMS) Docetaxel / Taxotere® (Sanofi Aventis US)

	envolvidos em muitos processos celulares, incluindo mitose, citocinese e transporte vesicular	Nanopartícula paclitaxel (ABI-007) / Abraxane® (Abraxis BioScience, Inc.) Ixabepilone / IXEMPRA® (BMS)
Inibidores da quinase	As tirosinas quinases são enzimas dentro da célula que funcionam para ligar os grupos de fosfato ao aminoácido tirosina. Pelo bloqueio da capacidade da tirosina quinase protéica funcionar, estes fornecem uma ferramenta para controlar o crescimento das células cancerosas	Imatinib mesilato / Gleevec (Novartis) Sunitinib malato/Sutent® (Pfizer) Sorafenib tosilato/ Nexavar® (Bayer) Nilotinib cloridreto monoidrato / Tasigna® (Novartis)
Inibidores da síntese protéica	Induz a apoptose celular	L-asparaginase / Elspar® (Merck & Co.)
Agentes Imunoterápicos	Induz os pacientes de câncer a apresentarem responsividade imune	Interferon alfa Inibidor da angiogênese/Avastin® (Genentech) IL-2→ Interleucina 2 (Aldesleucina) / Proleucina® (Chiron) IL-12→ Interleucina 12
Hormônios	Terapias hormonais associadas com menopausa e envelhecimento buscam	Toremifene citrato / Fareston® (GTx, Inc.) Fulvestrant / Faslodex®

aumentar a quantidade de Raloxifeno HCL / Evista® certos hormônios no seu (Lilly) corpo para compensar Anastrazol / Arimidex® quanto aos declínios hormonais relacionados à (AstraZeneca) Letrosol/Femara® (Novartis) idade ou à doença. A terapia hormonal como um tratamento do câncer ou reduz o nível de hormônios específicos ou altera a capacidade dos cânceres de usarem estes hormônios para crescerem ou se espalharem.

Fadrozol (CGS 16949A) Exemestane / Aromasin® (Pharmacia & Upjohn) Leuprolide acetato /Eligard® (QTL USA) Lupron® (TAP Pharm.) Goserelin acetato/ Zoladex® (AstraZeneca) Triptorelin pamoato / Trelstar® (Watson Labs) Buserelin / Suprefact® (Sanofi Aventis) Nafarelin Cetrorelix / Cetrotide® (EMD Serono) Bicalutamida / Casodex® (AstraZeneca) Nilutamida / Nilandron® (Aventis Pharm.) Megestrol acetato/ Megace® Análogos de Somatostatina (Octreotida acetato /

		Sandostatin® (Novartis)
Glicocorticóides	Medicamentos antiinflamatórios usados para reduzir tumefação que causa dor do câncer.	Predinsolona Dexametasona / Decadron® (Wyeth)
Inibidores da aromatase	Inclui imidazóis	Cetoconazol
Inibidores mTOR	A via de sinalização de mTOR foi originalmente descoberta durante os estudos do agente imunossupressor rapamicina. Esta via altamente conservada regula a proliferação celular e o metabolismo em resposta a fatores ambientais ligando a sinalização do fator de crescimento celular através da fosfoinositídeo-3-quinase (PI-3K) ao crescimento, proliferação e angiogênese celulares.	Sirolimus (Rapamicina) / Rapamune® (Wyeth) Temsirolimus (CCI-779) / Torisel® (Wyeth) Deforolimus (AP23573) (Ariad Pharm.) Everolimus (RAD001) / Certican® (Novartis)
Agentes quimioterápicos		Adriamicina, 5-fluorouracil, Citoxina, Bleomicina, Mitomicina C, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas

Um ou mais agentes anticâncer podem ser administrados ou de forma simultânea ou antes ou após a administração de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da presente invenção.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas seguintes subseções.

## II. MÉTODOS PARA PRODUZIR ANTICORPOS DA INVENÇÃO

### (i) Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser produzidos com o uso de uma variedade de técnicas conhecidas, tais como a técnica de hibridização de células somáticas padrão descrita por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495, transformação viral ou oncogênica dos linfócitos B ou a técnica de apresentação de fago com o uso das bibliotecas de genes de anticorpos humanos. Em formas de realização particulares, os anticorpos são anticorpos monoclonais completamente humanos.

Consequentemente, em uma forma de realização, um método de hibridoma é usado para produzir um anticorpo que se liga ao ErbB3. Neste método, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado podem ser imunizados com um antígeno adequado de modo a eliciar linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que especificamente se ligarão ao antígeno usado para a imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos podem então ser usados com células de mieloma com o uso de um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 59-103 (Academic Press, 1986)]. O meio de cultura em que as células de hibridoma se achem em crescimento é ensaiado quanto à produção dos anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Após as células de hibridoma terem sido identificadas produzirem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados pelos procedimentos de diluição limitativa e

desenvolvidos por métodos padrão [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 59-103 (Academic Press, 1986)]. Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser desenvolvidas *in vivo* como tumores de ascite em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, do fluido da ascite, ou do soro, mediante procedimentos de purificação convencionais de imunoglobulina, tais como, por exemplo, A-Sepharose protéica, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise, ou 5 cromatografia de afinidade.

10

Em outra forma de realização, os anticorpos e porções de anticorpos que ligam ErbB3 podem ser isolados das bibliotecas de fago de anticorpos geradas com o uso das técnicas descritas, por exemplo, em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 15 624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) e Hoet *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348; Patentes U.S. nºs 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner *et al.*; Patentes U.S. nºs 5.427.908 e 5.580.717 para Dower *et al.*; Patentes U.S. nºs 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty *et al.*; e Patentes U.S. nºs 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 20 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths *et al.*. Adicionalmente, a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) mediante embaralhamento de cadeia [Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)], bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fago muito grandes [Waterhouse *et al.*, 25 *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)] pode também ser usada.

Em uma forma de realização particular, o anticorpo monoclonal ou porção que se liga ao antígeno do mesmo que se ligam a ErbB3, é produzido com o uso da técnica de apresentação de fago descrita por Hoet *et al.* supra. Esta técnica envolve a geração de uma biblioteca de Fab

humana tendo uma única combinação de sequências de imunoglobulina isolada de doadores humanos e tendo diversidade sintética nas CDRs de cadeia pesada é gerada. A biblioteca é então examinada quanto à Fab que se liga ao ErbB3.

5                   Em ainda outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos direcionados contra ErbB3 podem ser gerados com o uso de camundongos transgênicos ou transcromossômicos carregando partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongos (ver, por exemplo, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisto em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546. Ver, ainda, as Patentes U.S. nºs 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 10 5.874.299; e 5.770.429; todas para Lonberg e Kay; a Patente U.S. nº 5.545.807 para Surani *et al.*; as Publicações PCT nºs WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas para Lonberg e Kay; e a Publicação PCT nº WO 01/14424 para Korman 15 *et al.*).

20                   Em outra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção podem ser formados com o uso de um camundongo que carregue as sequências de imunoglobulina humana nos transgenes e nos transcromossomas, tal como um camundongo que carregue um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana (ver, por exemplo, a Publicação PCT WO 02/43478 para Ishida *et al.*).

25                   Além do mais, os sistemas alternativos de animais transgênicos expressando genes de imunoglobulina humanos acham-se disponíveis na técnica e podem ser usados para formar anticorpos anti-ErbB3 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como

Xenocamundongo (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. nºs 5.939.598, 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584 e 6.162.963 para Kucherlapati *et al.*

Além disso, os sistemas de animais transcromossômicos alternativos expressando os genes de imunoglobulina humana acham-se disponíveis na técnica e podem ser usados para formar os anticorpos anti-ErbB3 da invenção. Por exemplo, os camundongos carregando tanto um transcromossoma de cadeia pesada humana quanto um transcromossoma de cadeia leve humana podem ser usados, como descrito em Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Além disso, vacas carregando transcromossomas humanos de cadeia pesada e leve foram descritas na técnica [Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894] e podem ser usados para formar os anticorpos anti-ErbB3 da invenção. Em ainda outra forma de realização, os anticorpos da presente invenção podem ser preparados com o uso de células de uma planta transgênica e/ou de planta cultivada (tal como, por exemplo, tabaco, milho e lentilha d'água) que produzem tais anticorpos. Por exemplo, as folhas do tabaco transgênico expressando anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno podem ser usadas para produzir tais anticorpos, por exemplo pelo uso de um promotor indutível [ver, por exemplo, Cramer *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 95-118 (1999)]. Igualmente, o milho transgênico pode ser usado para expressar tais anticorpos e suas porções de ligação a antígeno [ver, por exemplo, Hood *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 (1999)]. Os anticorpos podem também ser produzidos em grandes quantidades a partir das sementes de plantas transgênicas que incluam porções de anticorpos, tais como anticorpos de cadeia única (scFv's), por exemplo, com o uso das sementes de tabaco e dos tubérculos da batata [ver, por exemplo, Conrad *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109 (1998)]. Métodos de produzir anticorpos ou porções de ligação a antígeno nas plantas podem também ser encontrados, por exemplo, em

Fischer *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 99-108 (1999), Ma *et al.*, *Trends Biotechnol.* 13: 522-527 (1995); Ma *et al.*, *Plant Physiol.* 109: 341-346 (1995); Whitelam *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940-944 (1994) e nas Patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.040.498 e 6.815.184.

5 A especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais ou suas porções, que ligam o ErbB3 preparado com o uso de qualquer técnica, incluindo aquelas aqui apresentadas, pode ser determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como o radioimunoensaio (RIA) ou o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). A afinidade de ligação de um anticorpo monoclonal ou porção deste 10 também pode ser determinada pela análise de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

15 Em certas formas de realização, um anticorpo de ErbB3 ou sua porção, produzidos com o uso de qualquer um dos métodos acima examinados, podem ser ainda alterados ou otimizados para se obter uma especificidade de ligação e/ou afinidade desejadas com o uso de técnicas reconhecidas na prática, tais como aquelas aqui descritas.

20 Em uma forma de realização, as sequências parciais de anticorpos derivadas de um anticorpo de ErbB3 podem ser usadas para produzir anticorpos estrutural e funcionalmente relacionados. Por exemplo, os anticorpos interagem predominantemente com antígenos alvo através dos resíduos de aminoácidos que são localizados nas seis regiões determinantes da complementaridade (CDRs). Por esta razão, as sequências de aminoácidos dentro das CDRs são mais variadas entre os anticorpos individuais do que as 25 sequências fora das CDRs. Tendo em vista que as sequências de CDR são responsáveis pela maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades dos anticorpos específicos de ocorrência natural pela construção de vetores de expressão que incluem sequências de CDR do anticorpo específico de

ocorrência natural enxertado nas sequências de estrutura de um anticorpo diferente com diferentes propriedades (ver, por exemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525; e Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033). Tais 5 sequências de estrutura podem ser obtidas de bancos de dados de DNA que incluam sequências de genes de anticorpos da linha germinativa.

Assim, um ou mais aspectos estruturais de um anticorpo anti-ErbB3 da invenção, tal como as CDRs, podem ser usados para criar anticorpos anti-ErbB3 estruturalmente relacionados que retenham pelo menos 10 uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, por exemplo, inibindo a fosforilação de ErbB3 mediada por ligando semelhante a EGF; inibindo um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou sinalização mediada pela birregulina através de ErbB3; inibindo a proliferação ou a células expressando ErbB3; e/ou reduzindo os níveis de ErbB3 sobre as superfície 15 celulares.

Em uma forma de realização particular, uma ou mais regiões CDR selecionadas das SEQ ID NOs: 7 a 12, SEQ ID NOs: 13 a 18, SEQ ID NOs: 19 a 24, SEQ ID NOs: 39 a 44 e SEQ ID NOs: 45 a 50 são combinadas recombinantemente com regiões conhecidas da estrutura humana e as CDRs 20 para criar anticorpos adicionais anti-ErbB3 recombinantemente engendrados da invenção. As regiões de estrutura variável de cadeia pesada e leve podem ser derivadas das mesmas ou de diferentes sequências de anticorpos.

É bem conhecido na técnica que os domínios de CDR3 de anticorpos de cadeia pesada e leve desempenham um papel particularmente 25 importante na especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno [ver Hall *et al.*, *J. Immunol.*, 149: 1605-1612 (1992); Polymenis *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5318-5329 (1994); Jahn *et al.*, *Immunobiol.*, 193: 400-419 (1995); Klimka *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 296: 833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:

8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 2161-2162 (1994); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.*, 157: 739-749 (1996)]. Consequentemente, em certas formas de realização, são gerados anticorpos que incluem CDR3s de cadeia pesada e/ou leve dos anticorpos particulares aqui descritos (por exemplo, SEQ ID NOs: 9, 15, 21, 41, 47 e/ou SEQ ID NOs: 12, 18, 24, 44, 50). Os anticorpos podem ainda incluir a CDR1 e/ou as CDR2s de cadeia pesada e/ou leve dos anticorpos da presente invenção (por exemplo, SEQ ID NOs: 7 e 8 e/ou SEQ ID NOs: 10 e 11; SEQ ID NOs: 13 e 14 e/ou SEQ ID NOs: 16 e 17; SEQ ID NOs: 20 e 21 e/ou SEQ ID NOs: 22 e 23; SEQ ID NOs: 39 e 40 e/ou SEQ ID NOs: 42 e 43; ou SEQ ID NOs: 45 e 46 e/ou SEQ ID NOs: 48 e 49).

As regiões CDR1, 2 e/ou 3 dos anticorpos engendrados descritos acima podem compreender sequência(s) de aminoácidos exatas como aquelas aqui apresentadas (por exemplo, CDRs de Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 ou Ab #19, apresentadas nas SEQ ID NOs: 7 a 12, 13 a 18, 19 a 24, 39 a 44 e 45 a 50, respectivamente). Entretanto, o técnico comumente versado observará que algum desvio das sequências de CDR exatas pode ser possível, enquanto ainda retendo a capacidade do anticorpo de ligar-se ao ErbB3 eficazmente (por exemplo, substituições conservativas de aminoácidos). Consequentemente, em outra forma de realização, o anticorpo engendrado pode ser composto de uma ou mais CDRs que sejam, por exemplo, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % ou 99,5 % idênticas a uma ou mais CDRs de Ab #6, Ab #3 ou Ab #14.

Em outra forma de realização, um ou mais resíduos de uma CDR podem ser alterados para modificar a ligação para se obter uma associação de ligação mais propícia. Com o uso desta estratégia, um anticorpo que tenha afinidade de ligação ultraelevada de, por exemplo,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  ou mais, pode ser obtido. As técnicas de maturação da afinidade, bem conhecidas na técnica, e aquelas aqui descritas, podem ser usadas para alterar a(s)

região(ões) seguido pela triagem das moléculas de ligação resultantes para a mudança desejada na ligação. Em consequência, as CDR(s) são alteradas, as mudanças na afinidade de ligação, bem como a imunogenicidade podem ser monitoradas e classificadas de tal maneira que um anticorpo otimizado para a melhor ligação combinada e baixa imunogenicidade seja obtido.

Além ou ao invés das modificações dentro das CDRs, modificações podem também ser feitas dentro de uma ou mais das regiões de estrutura, FR1, FR2, FR3 e FR4, das regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo, contanto que estas modificações não eliminem a afinidade de ligação do anticorpo.

Em outra forma de realização, o anticorpo é ainda modificado com relação à função efetora, de modo a intensificar a eficácia do anticorpo no tratamento do câncer, por exemplo. Por exemplo, o(s) resíduo(s) de cisteína podem ser introduzidos na região Fc, por esse meio possibilitando a formação de ligação dissulfeto entre cadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou morte celular mediada pelo complemento aumentada e citotoxicidade dependente de células mediadas pelo anticorpo (ADCC). Ver Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shope, *B. J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral intensificada podem também ser preparados com o uso de ligadores cruzados heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al.* *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser engendrado um anticorpo que tenha regiões Fc duais e possa por esse meio ter lise complementar e capacidades de ADCC intensificadas. Ver Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

Também considerados pela presente invenção são os anticorpos biespecíficos e os imunoconjugados, como examinado abaixo.

(ii) Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos da presente invenção incluem pelo menos uma especificidade de ligação para ErbB3 e pelo menos uma especificidade de ligação para outro antígeno, tal como o produto de um oncogene. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento natural ou fragmentos de anticorpos [por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>].

Métodos para produzir anticorpos biespecíficos são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, as WO 05117973 e WO 06091209). Por exemplo, a produção de anticorpos biespecíficos de comprimento natural pode basear-se na coexpressão de dois pares de imunoglobulina de cadeia pesada-cadeia leve, em que as duas cadeias têm diferentes especificidades [ver, por exemplo, Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Outros detalhes de gerar anticorpos biespecíficos podem ser encontrados, por exemplo, em Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986) e em Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985), que descrevem um processo de ligação química para produzir anticorpos biespecíficos. Várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente da cultura de células recombinantes também foram descritas. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos têm sido produzidos com o uso de zíperes de leucina [ver, por exemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)]. Outra estratégia para produzir fragmentos biespecíficos de anticorpo pelo uso de dímeros Fv de cadeia única (sFv) foi também relatada [ver, por exemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)].

Em uma forma de realização particular, o anticorpo biespecífico compreende um primeiro anticorpo ou sua porção de ligação, que se liga a ErbB3, e um segundo anticorpo ou sua porção de ligação que se liga a ErbB2, ERbB3, ErbB4, EGFR, IGF1-R, C-MET, Lewis Y, MUC-1, EpCAM, CA125, antígeno da membrana específica da próstata, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , C-KIT, ou qualquer dos receptores FGF.

(iii) Imunoconjugados

Os imunoconjugados da presente invenção podem ser formados pela conjugação dos anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno aqui descritos, a outro agente terapêutico. Agentes adequados incluem, por exemplo, um agente citotóxico (por exemplo, um agente quimioterápico), uma toxina (por exemplo uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, de planta ou de animal, ou fragmentos desta), e/ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado). Agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos, que podem ser usados, incluem a cadeia A da difteria, fragmentos ativos de não ligação da toxina da difteria, cadeia A da exotoxina (da *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina, cadeia A da abrina, cadeia A da modecina, alfa-sarcina, proteínas da *Aleurites fordii*, proteínas da *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da *momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos acham-se disponíveis para a produção de anticorpos anti-ErbB3 radioconjugados. Exemplos incluem  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186}\text{Re}$ .

Os imunoconjugados da invenção podem ser produzidos com o uso de uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais, tais como o N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), o iminotiolano (IT), os derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como o adipimidato de dimetila HCL), ésteres ativos (tais como o suberato de dissuccinimidila), aldeídos (tais como o glutaraldeído), compostos bis-azido [tais como o bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina], os derivados de bis-diazônio [tais como o bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina], diisocianatos (tais como o 2,6-diisocianato de tolueno), e os compostos de flúor bis-ativos (tais como o 1,5-difluoro-2,4-dinitro-benzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina

5 pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). O ácido carbon-14-rotulado 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) é um exemplo de agente de quelação para a conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo (ver, por exemplo, a WO 94/11026).

### III. MÉTODOS PARA A TRIAGEM DOS ANTICORPOS DA INVENÇÃO

Subsequentemente à produção dos anticorpos ou porções de ligação a抗ígenos que se ligam ao ErbB3, tais anticorpos, ou suas porções, podem ser separados quanto a várias propriedades, tais como aquelas aqui descritas, com o uso de uma variedade de ensaios que são bem conhecidos na técnica.

10 Em uma forma de realização, os anticorpos ou suas porções de ligação a抗ígeno são triados quanto à capacidade de inibir a fosforilação do ErbB3 mediada pelo ligando semelhante a EGF. Isto pode ser feito pelo tratamento das células que expressam ErbB3 com um ligando semelhante a EGF na presença e na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao抗ígeno do mesmo. As células podem então ser lisadas e os lisados brutos podem ser centrifugados para remover o material insolúvel. A fosforilação do ErbB3 pode ser medida, por exemplo, por Western blotting, seguido por sondagem 15 com um anticorpo antifosfotirosina, como descrito em Kim *et al.*, acima, e 20 com os Exemplos abaixo.

Em outras formas de realização, os anticorpos e porções de ligação a抗ígeno são ainda separados quanto a uma ou mais das seguintes propriedades: (1) inibição da sinalização mediada pelo ligando de ErbB3 (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) através do ErbB3; (2) inibição da proliferação das células que expressam ErbB3; (3) a capacidade de reduzir níveis de ErbB3 sobre a superfície celular (por exemplo, pela indução da internalização do ErbB3); (4) inibição da secreção de VEGF das células que expressam ErbB3; (5) inibição da migração das células que

expressam ErbB3; (6) inibição do crescimento esferóide das células que expressam ErbB3; e/ou (7) ligação a um epítopo localizado no domínio I do ErbB3, cada dos quais podendo ser facilmente medidos com o uso de técnicas reconhecidas na prática e aquelas aqui examinadas.

5 A inibição de um dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou sinalização mediada pela birregulina através do ErbB3 pode ser facilmente medida com o uso de ensaios de rotina, tais como os descritos em Horst *et al.*, acima. Por exemplo, a capacidade de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo para inibir a herregulina, epirregulina, epigênio ou a sinalização mediada pela birregulina através do ErbB3 pode ser medida por ensaios da quinase quanto aos substratos conhecidos do ErbB3, tais como, por exemplo, SHC e PI3K, como descrito, por exemplo, em Horst *et al.*, acima, Sudo *et al.*, (2000) *Methods Enzymol.*, 322: 388-392; e Morgan *et al.* (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191: 761-767, em seguida ao estímulo por um ou mais 10 dentre a herregulina, pirregulina, epigênio ou birregulina. Consequentemente, as células que expressam ErbB3 podem ser estimulada com um ou mais dentre herregulina, pirregulina, epigênio ou birregulina, e incubadas com um anticorpo candidato ou porção que se liga ao antígeno do mesmo. Os lisados celulares subsequentemente preparados de tais células podem ser 15 imunoprecipitados com um anticorpo para um substrato de ErbB3 (ou uma proteína em uma via celular envolvendo o ErbB3), tal como, por exemplo, um anticorpo anti-JNK-1, e ensaiadas quanto à atividade da quinase (por exemplo, a atividade da quinase JNK ou a atividade quinase PI3) com o uso de técnicas reconhecidas na prática.

20 25 Um decréscimo ou desaparecimento completo no nível ou na atividade (por exemplo, atividade da quinase) de um substrato de ErbB3 ou proteína em uma via envolvendo ErbB3 na presença do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, em relação ao nível ou atividade na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, é

indicativo de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno que inibe um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou sinalização mediada pela birregulina.

Em certas formas de realização, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo inibe a sinalização mediada pelo ligando de ErbB3 (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) pela redução da ligação de um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina ao ErbB3.

De modo a selecionar quanto àqueles anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno que inibem a ligação de um ou mais dentre herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina ao ErbB3, as células que expressam ErbB3 (por exemplo as células MALME-3M, como descrito nos Exemplos abaixo) podem entrar em contato com um ligando de ErbB3 rotulado (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina radiorrotulados) na ausência (controle) ou na presença do anticorpo anti-ErbB3 ou porção que se liga ao antígeno do mesmo. Se o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo inibem a ligação da herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina ao ErbB3, então uma redução estatisticamente significativa na quantidade do rótulo recuperado (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina radiorrotulados), em relação à quantidade na ausência do anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, será observada.

O anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo podem inibir a ligação do ligando de ErbB3 (por exemplo, herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) por qualquer mecanismo. Por exemplo, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo podem inibir a ligação do ligando de ErbB3 (por exemplo, um ou mais dentre a herregulina, epirregulina, epigênio ou birregulina) ao ErbB3 por ligação ao mesmo sítio ou a um sítio de sobreposição sobre o ErbB3 como o ligando de ErbB3.

Alternativamente, o anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo pode inibir a ligação de um ligando de ErbB3 pela alteração ou distorção da conformação do ErbB3, de tal modo que ele fique incapaz de ligar-se ao ligando de ErbB3.

5 Os anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno que reduzem os níveis de ErbB3 sobre as superfícies celulares podem ser identificados por sua capacidade de inibir a ligação a antígeno\ reduzem a expressão da superfície celular do ErbB3 pela indução de internalização (ou aumento da endocitose) do ErbB3. Para testar isto, o ErbB3 pode ser biotinilado e o número de moléculas de ErbB3 sobre a superfície das células pode ser facilmente determinado, por exemplo pela medição da quantidade de biotina sobre a monocamada das células na cultura na presença ou ausência de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo, por exemplo, como descrito, por exemplo, em Waterman *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1998), 273: 13819-13827, seguida pela imunoprecipitação do ErbB3 e sondagem com estreptavidina. Uma redução na detecção de ErbB3 biotinilado através do tempo na presença de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno é indicativo de um anticorpo que reduza os níveis do ErbB3 sobre as superfícies das células.

20 Os anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno da presente invenção podem também ser testados quanto à sua capacidade de inibir a proliferação das células que expressam ErbB3, por exemplo as células tumorais, com o uso de técnicas reconhecidas na prática, tais como o Ensaio Cell Titer Glow descrito nos Exemplos abaixo (ver, também, por exemplo, Macallan *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci.* (1998) 20; 95(2): 708-713; Perez *et al.* (1995) *Cancer Research* 55, 392-398).

25 Em outra forma de realização, os anticorpo ou suas porções de ligação a antígeno\ são ensaiados quanto à capacidade de inibir a secreção do

VEGF das células que expressam ErbB3. Isto pode ser feito pelo uso de ensaios bem conhecidos, tais como o kit VEGF ELISA disponível da R&D Systems (Minneapolis, MN, Cat. #DY293B). De forma semelhante, os anticorpos ou porções podem ser ensaiados quanto à capacidade de inibir a migração das células que expressam ErbB3 (por exemplo, as células MCF-7) com o uso de um ensaio de trans-reservatório (Millipore Corp., Billerica, MA, Cat # ECM552) como aqui descrito.

Em outra forma de realização, os anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno são ensaiados quanto à capacidade de inibir o crescimento esferóide das células que expressam o ErbB3. Isto pode ser feito pelo uso de um ensaio que aproxime as condições de um crescimento de tumor em desenvolvimento [ver, por exemplo, Herman *et al.* (2007) *Journal of Biomolecular Screening Electronic publication*) como aqui descrito.

Os anticorpos ou suas porções de ligação a antígeno que se ligam aos mesmos epítopos ou aos epítopos de sobreposição, como um ou mais anticorpos da presente invenção, também podem ser identificados com o uso de técnicas padrão conhecidas na prática e aqui descritas. Por exemplo, de modo a ensaiar quanto aos anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo ou a um epítopo de sobreposição no ErbB3 ligado por um anticorpo de interesse, um ensaio de bloqueio cruzado, tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser realizado.

#### IV. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo uma composição farmacêutica, contendo uma combinação de anticorpos monoclonais, ou sua(s) porção(ões) de ligação a antígeno, da presente invenção, formulada junto com um carreador farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização, as composições incluem uma combinação de anticorpos isolados múltiplos (por exemplo, dois ou mais) da

invenção, que ligam diferentes epítopes no ErbB3.

Como aqui usado, “carreador farmaceuticamente aceitável” inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento isotônico e da absorção, e outros, que sejam fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o carreador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, o anticorpo, a molécula biespecífica e multiespecífica, podem ser aplicados a um material para proteger o composto contra a ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

Um “sal farmaceuticamente aceitável” refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto precursor e não comunica quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis [por exemplo, ver Berge, S. M. *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19]. Exemplos de tais sais incluem os sais de adição de ácido e os sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como os ácidos clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídico, fosforoso e outros, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como os ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, os ácidos alcanoicos fenil-substituídos, os ácidos hidróxi alcanoicos, os ácidos aromáticos, os ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos, e outros. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino-terrosos, tais como o sódio, potássio, magnésio, cálcio etc., bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outros.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas isoladamente ou em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma

composição da presente invenção com pelo menos um ou mais agentes terapêuticos adicionais tais como os agentes anticâncer descritos abaixo. As composições farmacêuticas da invenção podem também ser administradas em combinação com a terapia de radiação e/ou com a cirurgia.

5           Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será observado pelo técnico habilitado, a via e/ou o modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com carreadores que protejam o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como o vinil acetato de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a 10 preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos daqueles habilitados na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

20           Para se administrar um composto da invenção por certas vias de administração, pode ser necessário cobrir o composto, ou coadministrar o composto, com um material para impedir sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um indivíduo em um carreador apropriado, por exemplo lipossomas, ou um diluente. Diluentes farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções salinas ou de tampão aquosas. Os lipossomas 25 incluem as emulsões de CGF de água-em-óleo-em-água, bem como lipossomas convencionais [Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7: 27].

Carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para as

substâncias farmaceuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que quaisquer meios ou agentes convencionais sejam incompatíveis com o composto ativo, o seu uso nas composições farmacêuticas da invenção é considerado. Os compostos suplementares ativos 5 podem também ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de produção e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração medicamentosa. O carreador pode . 10 ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido, e outros), e misturas destes adequadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requerido no caso de dispersão, e pelo 15 uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio, na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada pela inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo os sais de monoestearato e a gelatina.

20 As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ingrediente ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Em geral as dispersões são preparadas pela incorporação do 25 composto ativo em um veículo estéril que contenha um meio básico de dispersão e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injetáveis, os métodos preferidos de preparação são a secagem em vácuo e a secagem por congelamento (liofilização) que produzem um pó do ingrediente ativo mais

qualquer ingrediente adicional desejado de uma sua solução previamente filtrada de forma estéril.

Os regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo único pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas através do tempo ou a dose pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente como indicado pelas exigências da situação terapêutica. Por exemplo, os anticorpos humanos da invenção podem ser administrados uma ou duas vezes semanalmente por injeção subcutânea ou uma ou duas vezes mensalmente por injeção subcutânea.

É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária, como aqui usada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; Cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dosagem unitárias da invenção é ditada pelas, e diretamente dependente, (a) das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico a ser obtido, e (b) das limitações inerentes na técnica de compor um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade nos indivíduos.

Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridreto de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e outros; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como o palmitato de ascorbila, o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, e outros; e (3) agentes de quelação de metais, tais como o ácido cítrico, o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA),

sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e outros.

Quanto às composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem aquelas adequadas para administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As 5 formulações podem convenientemente ser apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única, variará dependendo do indivíduo em tratamento, e do modo particular de 10 administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única será em geral aquela quantidade da composição que produza um efeito terapêutico. Geralmente, fora dos cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,001 por cento a cerca de noventa por cento do ingrediente ativo, preferivelmente 15 de cerca de 0,005 por cento a cerca de 70 %, o mais preferível de cerca de 0,01 por cento a cerca de 30 por cento.

As formulações da presente invenção que são adequadas para a administração vaginal também incluem pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização contendo tais carreadores, 20 conhecidos na técnica como sendo apropriados. As formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica das composições desta invenção incluem pós, pulverizações, unguedos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um carreador farmaceuticamente aceitável, e com quaisquer 25 preservativos, tampões ou propulsores que possam ser necessários.

As expressões “administração parenteral” e “administrado parenteralmente” como aqui usadas, significam modos de administração outros que não a administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e incluem, sem limitação, a injeção e infusão intravenosas, intramusculares,

intraarteriais, intratecais, intracapsulares, intraorbitais, intracardíacas, intradérmicas, intraperitoneais, transtraqueais, subcutâneas, subcuticulares, intraarticulares, subcapsulares, subaracnóideas, intraespinhais, epidurais e intraesternais.

5 Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e outros), e suas misturas adequadas, óleos vegetais, tais como o azeite, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como o oleato de etila. A fluidez apropriada 10 pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requeridos no caso das dispersões, e pelo uso de tensoativos.

15 Estas composições podem também conter adjuvantes tais como preservativos, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Exemplos particulares de adjuvantes que são bem conhecidos na técnica incluem, por exemplo, adjuvantes inorgânicos (tais como os sais de alumínio, por exemplo o fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio), adjuvantes orgânicos (por exemplo, esqualeno), adjuvantes à base de óleo, 20 virossomas (por exemplo, virossomas que contêm uma hemaglutinina ligada à membrana e neuraminidase derivada do vírus da influenza).

25 A prevenção da presença de microorganismos pode ser garantida tanto por procedimentos de esterilização, acima, quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo parabeno, clorobutanol, ácido fórmico fenólico, e outros. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e outros, nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pela inclusão de agentes que retardem a absorção, tais como o monoestearato de alumínio e a gelatina.

Quando os compostos da presente invenção são administrados

como produtos farmacêuticos, a seres humanos e animais, eles podem ser dados isoladamente ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,001 a 90 % (mais preferível 0,005 a 70 %, tal como 0,01 a 30 %) do ingrediente ativo em combinação com um carreador farmaceuticamente aceitável.

Independente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que podem ser usados em uma forma hidratada adequada, e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formulados nas formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis, por métodos convencionais conhecidos daqueles de experiência na técnica.

Os níveis reais de dosagem dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter-se uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para se obter a resposta terapêutica desejada para uma composição de paciente particular, e modo de administração sem que seja 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 seu éster, sal ou amida, da via de administração, do tempo de administração, da velocidade de excreção do composto particular sendo empregado, da duração do tratamento, de outros medicamentos, 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 em tratamento, e outros fatores bem conhecidos nas técnicas médicas. Um médico ou veterinário tendo experiência normal na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica requerida. Por exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica em níveis mais baixos do que aquele requerido de modo a obter-se o efeito terapêutico desejado e gradualmente aumentar a dosagem até que o

efeito desejado seja obtido. Em geral, uma dose diária adequada de uma composição da invenção será aquela quantidade do composto que seja a dose menor eficaz para produzir um efeito terapêutico. Uma tal dose eficaz em geral dependerá dos fatores descritos acima. É preferível que a administração seja intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, preferivelmente administrada próxima ao local do alvo. Se desejável, a dose diária eficaz de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriado durante todo o dia, opcionalmente nas formas de dosagem unitária. Embora seja possível que um composto da presente invenção seja administrado isoladamente, é preferível administrá-lo como uma formulação farmacêutica (composição).

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma forma de realização preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos apresentados nas Patentes U.S. nºs 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: a Patente U.S. nº 4.487.603, que apresenta uma bomba de microinfusão implantável para dispersar medicamento em uma velocidade controlada; a Patente U.S. nº 4.486.194, que apresenta um dispositivo terapêutico para administrar medicamento através da pele; a Patente U.S. nº 4.447.233, que apresenta uma bomba de infusão de medicamento para liberar medicamento em uma velocidade de infusão precisa; a Patente U.S. nº 4.447.224, que apresenta um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua do medicamento; a Patente U.S. nº 4.439.196, que apresenta um sistema de liberação osmótica do medicamento tendo compartimentos de múltiplas câmaras; e a Patente U.S. nº 4.475.196, que apresenta um sistema

de liberação osmótica do medicamento. Muitos outros de tais implantes, sistemas de liberação e módulos são conhecidos daqueles versados na técnica.

Em certas formas de realização, os anticorpos monoclonais da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejável), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Quanto aos métodos de fabricar lipossomas, ver, por exemplo, as Patentes U.S. 4.522.811, 5.374.548 e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender um ou mais componentes que sejam seletivamente transportados dentro de células ou órgãos específicos, assim intensificando a liberação do medicamento alvo [ver, por exemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685]. Componentes alvos de exemplo incluem o folato ou a biotina (ver, por exemplo, a Patente U.S. 5.416.016 para Low *et al.*); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticorpos [P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180]; receptor da proteína A tensoativa [Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134], diferentes espécies das quais podem compreender as formulações da invenção, bem como componentes das moléculas inventadas; p120 [Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090]; ver também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

## V. MÉTODOS DE USAR OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO

A presente invenção também fornece métodos de usar anticorpos e suas porções de ligação a antígeno, que ligam ErbB3 em uma variedade de aplicações diagnósticas e terapêuticas *ex vivo* e *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser usados para tratar de uma doença associada com a sinalização dependente de ErbB3, incluindo uma

variedade de cânceres.

Em uma forma de realização, a presente invenção fornece um método para tratar de uma doença associada com a sinalização dependente do ErbB3 pela administração a um indivíduo de um anticorpo ou porção que se liga ao antígeno do mesmo da invenção, em uma quantidade eficaz para tratar da doença. Doenças adequadas incluem, por exemplo, uma variedade de cânceres, incluindo, porém sem limitar, melanoma, câncer de mamas, câncer ovariano, carcinoma renal, câncer gastrintestinal, câncer do cólon, câncer pulmonar e câncer da próstata.

O anticorpo pode ser administrado isoladamente ou com outro agente terapêutico que atue em combinação ou sinergisticamente com o anticorpo para tratar da doença associada com a sinalização mediada pelo ErbB3. Tais agentes terapêuticos incluem, por exemplo, os agentes anticâncer descritos abaixo (por exemplo, citotoxinas, agentes quimioterápicos, moléculas pequenas e radiação).

Em outra forma de realização, a presente invenção fornece um método para diagnosticar uma doença (por exemplo um câncer) associada com a regulação positiva do ErbB3 em um indivíduo, mediante o contato dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno da invenção (por exemplo, *ex vivo* ou *in vivo*) com células do indivíduo, e medindo-se o nível de ligação ao ErbB3 sobre as células. Níveis anormalmente elevados de ligação ao ErbB3 indicam que o indivíduo tem uma doença associada com a regulação positiva do ErbB3.

Igualmente dentro do escopo da presente invenção são os kits compreendendo anticorpos e suas porções de ligação a antígeno da invenção, que opcionalmente incluem instruções para uso no tratamento ou no diagnóstico de uma doença associada com a regulação positiva do ErbB3 e/ou a sinalização dependente do ErbB3. Os kits podem incluir um rótulo indicando o uso pretendido dos conteúdos do kit. O termo rótulo inclui

quaisquer materiais escritos de comercialização ou material registrado fornecido no, ou com, o kit, ou que de outra forma acompanhe o kit.

Outras formas de realização da presente invenção são descritas nos seguintes Exemplos.

5 A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como limitativos. Os conteúdos da Listagem de Sequências, as figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados citados na totalidade deste pedido, ficam expressamente aqui incorporados como referência.

· 10 EXEMPLOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Na totalidade dos exemplos, os seguintes materiais e métodos foram usados, a menos que de outra forma estabelecido.

Em geral, a prática da presente invenção emprega, a menos que de outra forma indicado, técnicas convencionais de química, biologia molecular, tecnologia de DNA recombinante, imunologia (em especial, por exemplo, a tecnologia de anticorpos), e técnicas padrão na preparação de polipeptídeos. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Série de Abordagem Prática, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); e *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992). Sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* para ensaiar a biologia de HCV são descritos, por exemplo, em *Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C, Lab. Anim.* (NY); 34(2): 39-47 (2005) e em *The chimpanzee model of hepatitis C virus infections, ILAR J.*; 42(2): 117-126 (2001).

## LINHAGENS CELULARES

Todas as linhagens celulares usadas nas experiências descritas abaixo foram obtidas do National Cancer Institute ou fornecidas por pesquisadores, como indicado.

5 Linhagens Celulares:

MCF7- ATCC cat. nº HTB-22

T47D- ATCC cat. nº HTB-133

Colo357- Estas células foram obtidas de um pesquisador acadêmico e são descritas por Kolb *et al.* (2006) Int. J. Cancer, 120: 514-523.

10 Du145- ATCC cat. nº HTB-81

OVCAR8- fonte já descrita no pedido provisório.

H1975 ATCC cat. nº CRL-5908

### Pulverização das Células Tumorais

Um criopulverizador (Covaris Inc.) foi usado para a pulverização dos tumores. Os tumores foram armazenados em sacos especiais (pré-pesados antes da adição do tumor) e colocados em nitrogênio líquido enquanto eram manipulados. Quanto aos tumores pequenos, 200 ul de tampão de lise foram primeiramente adicionados ao seco contendo o tumor, congelados em nitrogênio líquido e depois pulverizados para melhorar a recuperação do tumor do saco. Os tumores pulverizados foram transferidos para tubos Eppendorf de 2 ml e colocados em nitrogênio líquido até prontos para outro processamento.

### Lise das Células Tumorais

Os tumores foram lisados em tampão de Lise suplementado com inibidores da protease e da fosfatase. O tampão de Lise foi adicionado às alíquotas tumorais em uma concentração final de cerca de 62,5 mg/ml. As amostras de tumores foram homogeneizadas por turbilhonamento por 30 segundos, e incubação sobre gelo por cerca de 30 minutos. Os lisados foram centrifugados por cerca de 10 minutos em colunas Qiagen Qiashredder para

outra homogeneização das amostras. Os lisados purificados foram divididos em alíquotas em tubos frescos para outro processamento.

#### Ensaio de BCA

O ensaio de BCA (Pierce) foi realizado seguindo-se o protocolo do fabricante, sobre todas as amostras tumorais. A concentração protéica total (em mg/ml) de cada amostra tumoral foi mais tarde usada na normalização dos resultados do ELISA.

#### Ensaio de ELISA

Todos os reagentes do ELISA para os ELISAs totais e de fosfo-ErbB3 foram comprados da R&D Systems como kits DuoSet. Placas Nunc Maxisorb de 96 reservatórios foram revestidas com 50  $\mu$ l de um anticorpo e incubadas durante a noite na temperatura ambiente. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). As placas foram subsequentemente bloqueadas por cerca de 1 hora na temperatura ambiente com 2 % de BSA em PBS. As placas foram lavadas 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). 50  $\mu$ l de lisados celulares e padrões diluídos em tampão de Lise a 50 % e 1 % de BSA foram usados em duplicata para outro processamento. As amostras foram incubadas por 2 horas em 4 °C sobre um agitador de placas e lavadas por 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Cerca de 50  $\mu$ l de um anticorpo de detecção diluído em BSA a 2 %, PBST foi adicionado e incubados por cerca de 1 hora na temperatura ambiente. Quanto ao fosfor-ErbB3, o anticorpo de detecção foi diretamente combinado com a peroxidase de raiz forte (HRP) e incubado por 2 horas na temperatura ambiente. A placa foi lavada por 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Cerca de 50  $\mu$ l de Esteptavidina-HRP foram adicionados e incubados por 30 minutos na temperatura ambiente (exceto quanto ao

pErbB3). As placas foram lavadas 3 vezes com 1000 µl/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Cerca de 50 µl de substrato Supersignal Pico ELISA foram adicionados e a placa foi lida com o uso de uma leitora de placas Fusion. Os dados foram analisados com o uso de EXCEL. As amostras em duplicata foram verificadas em média e barras de erro foram usadas para representar o desvio padrão entre as duas réplicas.

5 EXEMPLO 1

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS USANDO A APRESENTAÇÃO DE  
FAGO

10 De modo a obter-se anticorpos humanos anti-ErbB3 aqui referidos como Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 e Ab #19, uma biblioteca de Fab-fago humano incluindo uma combinação única de sequências de imunoglobulina obtidas de doadores humanos (Hoet *et al.* acima, aqui incorporado como referência em sua totalidade) foi inicialmente examinada  
15 quanto aos aglutinantes de ErbB3.

Com o uso de ErbB3 purificado e uma linhagem celular de ovário de hamster chinês expressando o ErbB3 da superfície celular, 73 sequências únicas de Fab da biblioteca foram identificadas. Estes 73 clones foram então reformados como Fab apenas sem o fago. Com o uso de métodos de alta produção, estes Fabs foram expressos em uma escala pequena e testados quanto à ligação com o uso de ELISA e o método Flexchip que é uma tecnologia de ressonância de plásmon superficial (SPR) de alta produção. Os 73 Fabs sem o fago foram manchados sobre uma superfície de fragmento e as cinéticas de ligação e o bloqueio do epítopo a uma proteína de fusão alvo  
20 ErbB3-his ou uma Fcproteína ErbB3 (R & D Systems) foram medidos. A constante de equilíbrio da ligação e os índices de liga/desliga para os Fabs foram calculados dos dados obtidos.

25

A ligação dos vários Fabs às células MALME-3M foi em seguida examinada com o uso de cerca de 500 nM dos Fabs e uma diluição a

1:750 de um anticorpo secundário Alexa 647 anti-humano de cabra. Como mostrado nas Figuras 1A e 1B, vários Fabs candidatos apresentaram manchamento apreciável das células MALME-3M.

#### EXEMPLO 2

##### 5 OTIMIZAÇÃO DOS Fabs ANTI-ErbB3

Subsequente à identificação dos Fabs que bloqueavam a ligação do ligando de ErbB3, a herregulina, ao ErbB3, as sequências VH e VL dos Fabs foram otimizadas pelo códon como segue.

Especificamente, as regiões VH e VL foram reformadas com o uso das construções de expressão para a expressão como um isótipo de IgG1 ou IgG2. As construções incluíram uma estrutura Selexis que tem um cassete destinado à substituição das sequências apropriadas de cadeias pesada e leve. Os vetores Selexis incluíram um promotor CMV e um sinal de adaptação poli-A.

15 As sequências de ácido nucleico para VH e VL de Ab #6 otimizadas pelo códon são apresentadas nas SEQ ID NOS: 25 e 26, respectivamente, e aquelas para Ab #3 são apresentadas nas SEQ ID NOS: 27 e 28, respectivamente, como mostrado na Figura 22.

#### EXEMPLO 3

##### 20 AFINIDADE DE LIGAÇÃO PARA ErbB3

As constantes de dissociação dos anticorpos anti-ErbB3 foram medidas com o uso de duas técnicas independentes, isto é, um Ensaio de Ressonância de Plásmon Superficial e um ensaio de ligação celular usando as células MALME-3M.

##### 25 ENSAIO DE RESSONÂNCIA SUPERFICIAL DE PLÁSMON

O Ensaio de Ressonância Superficial de Plásmon (também referido como ensaio de Flexchip) foi realizado como descrito em Wassaf *et al.* (2006) *Analytical Biochem.*, 351: 241-253. O valor de  $K_D$  foi calculado com base na fórmula  $K_D = K_d/K_a$ .

Os valores de  $K_D$  de Ab #6 e Ab #3, respectivamente, medido com o uso do Ensaio de Ressonância Superficial de Plásmon, são descritos nas Figuras 2A e 2B. Ab #6 tinha um valor de  $K_D$  de cerca de 4 nM e Ab #3 tinha um valor de  $K_D$  de cerca de 8 nM, como descrito nas Figuras 2A e 2B, 5 respectivamente.

#### ENSAIO DE LIGAÇÃO CELULAR

O ensaio de ligação celular para determinar os valores de  $K_D$  de Ab #6 e Ab #3 foi realizado como segue.

Células MALME-3M foram separadas com 2 ml de tripsina-  
10 EDTA + 2 ml de RPMI + 5 mM de EDTA na temperatura ambiente por 5 minutos. O RPMI completo (10 ml) foi adicionado imediatamente às células tripsinizadas, recolocado em suspensão suavemente e centrifugado em uma centrífuga de tampo de mesa Beckman em 1100 rpm por 5 minutos. As células foram recolocadas em suspensão em tampão de coloração BD (PBS +  
15 2 % de soro bovino fetal + 0,1 % de azida sódica, Becton Dickinson) em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por mililitro e alíquotas de 50  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  células) foram plaqueadas em uma placa tituladora de 96 reservatórios.

150  $\mu$ l de uma solução de anticorpo anti-ErbB3 de 200 nM (Ab #6 ou Ab #3) em tampão de coloração BD foram preparados em um tubo eppendorf e diluídos em série 2 vezes em 75  $\mu$ l de tampão de coloração BD. As concentrações do anticorpo diluído variaram de 200 nM a 0,4 nM. Alíquotas de 50  $\mu$ l das diluições de diferentes proteínas foram então acrescentadas diretamente à suspensão celular de 50  $\mu$ l, dando as concentrações finais de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12 nM, 6 nM, 3 nM, 1,5 nM, 25 0,8 nM, 0,4 nM e 0,2 nM do anticorpo.

As células divididas em alíquotas na placa de 96 reservatórios foram incubadas com as diluições protéicas por 30 minutos na temperatura ambiente em um agitador de plataforma e lavadas por 3 vezes com 300  $\mu$ l de tampão de coloração BD. As células foram então incubadas com 100  $\mu$ l de

uma diluição a 1:750 de IgG anti-humano de cabra rotulado de Alexa 647 em tampão de coloração BD por 45 minutos em um agitador de plataforma no ambiente frio. Finalmente, as células foram lavadas por duas vezes, pelotizadas e recolocadas em suspensão em 150  $\mu$ l de tampão de coloração BD + 0,5  $\mu$ g/ml de iodeto de propídio. A análise de 10.000 células foi feita em um citômetro de fluxo FACScalibur com o uso do canal FL4. Os valores de MFI e as correspondentes concentrações dos anticorpos anti-ErbB3 foram plotados no eixo dos y e no eixo dos x, respectivamente. O  $K_D$  da molécula foi determinado por GraphPad Prism com o uso do modelo de ligação de um sítio por uma curva de regressão não linear.

O valor  $K_D$  foi calculado com base na fórmula  $Y=Bmáx^*X/K_D + X$  ( $Bmáx$  = fluorescência na saturação.  $X$  = concentração de anticorpos.  $Y$  = grau de ligação). Como mostrado nas Figuras 2C e 2D, Ab #6 e Ab# 3 tinham valores  $K_D$  de cerca de 4 nM e 1,3 nM, respectivamente, em um ensaio de ligação celular usando células MALME-3M.

#### EXEMPLO 4

#### ESPECIFICIDADE DE LIGAÇÃO / LIGAÇÃO DE EPÍTOPO PELO ErbB3

A especificidade de ligação de um epítopo de IgG2 de Ab #6 ao ErbB3 foi ensaiada com o uso de ELISA, como segue. A identificação do epítopo ligado pelo Ab #6 foi também analisada.

Especificamente, placas Nunc Maxisorb de 96 reservatórios foram revestidas com 50  $\mu$ l de 5  $\mu$ g/ml de proteína [ErbB3 humano recombinante, EGFR humana recombinante, ou proteína não relacionada (BSA)] e incubadas durante a noite na temperatura ambiente. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas por 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório de PBST (0,05 % de Tween-20) na lavadora de placas Biotek. Os reservatórios foram bloqueados por 1 hora na temperatura ambiente com 2 % de BSA em PBS. As placas foram lavadas por 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório de PBST (0,05 % de Tween-20) na lavadora de placas BioTek. Cerca de 50  $\mu$ l do Ab

#6 foram adicionados em várias diluições (1  $\mu$ M e diluições em série por 2 vezes) em 2 % de BSA, PBST. Todas as amostras foram desenvolvidas em duplicada e incubadas por 2 horas em 4 °C em um agitador de placas. As placas foram lavadas 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório de PBST (0,05 % de Tween-20) na lavadora de placas BioTek. 50  $\mu$ l de anticorpo de detecção de IgG humano [HRP conjugado (Bethyl Inc; diluição de 1:75000 em 2 % de BSA, PBST)] foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram lavadas por 3 vezes com 1000  $\mu$ l/reservatório de PBST (0,05 % de Tween-20) na lavadora de placas BioTek. 50  $\mu$ l de substrato de ELISA Supersignal Pico foram adicionados e a placa foi lida na leitora de placas Fusion. Os dados foram analisados com o uso do programa EXCEL. Amostras em duplicada foram calculadas em média e as barras de erro representam o desvio padrão entre das duas réplicas.

Como mostrado na Figura 3, Ab #6 ligou-se ao ErbB3 recombinante em um ELISA, mas não foi observada qualquer ligação apreciável ao EGFR, BSA ou TGF- $\alpha$ .

Um fragmento (mutante de truncção) correspondente aos resíduos de aminoácidos 10 a 202 de ErbB3, foi clonado no vetor de apresentação de levedura pYD2 [uma versão modificada do pYD1 (Invitrogen) com um códon de parada construído em frente ao rótulo His] entre os sítios de restrição Nhe e BsiWI. O plasmídeo foi transformado na cepa de levedura EBY100 (Invitrogen) e os clones contendo o plasmídeo foram selecionados em meio seletivo Trp. O clone foi cultivado em meio contendo glicose durante a noite em 30 °C e a expressão do mutante de truncção de ErbB3 foi induzida pela transferência para um meio contendo galactose por 2 dias em 18 °C. O mutante de levedura apresentando a truncção de ErbB3 foi manchado com 50 nM de Ab #6, seguido por um anticorpo anti-humano de cabra rotulado com corante 647 Alexa. Uma amostra separada foi manchada com anticorpo anti-humano de cabra apenas

para mostrar que não existe nenhuma ligação não específica à levedura do anticorpo secundário. A análise foi realizada por citometria de fluxo sobre o separador de células FACS Calibur (BD Biosciences).

Como mostrado na Figura 30, o Ab #6 ligou-se ao mutante de truncação, isto é, aos resíduos de aminoácidos 20 a 202 do ErbB3.

#### 5 EXEMPLO 5

#### INFRARREGULAÇÃO DO ErbB3 TOTAL NAS CÉLULAS TUMORAIS

A capacidade do Ab #6 infrarregular a expressão de ErbB3 tanto *in vitro* quanto *in vivo* nas células tumorais, foi testada como segue.

10 Células MALME-3M foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 reservatórios, e cultivadas em meios RPMI suplementados com antibióticos, 2 mM de L-glutamina e 10 % de soro bovino fetal (FBS) por 24 horas em 37 °C, e 5 % de dióxido de carbono. Os meios foram então trocados para meios RPMI-1640 com antibióticos, 2 mM de L-glutamina com e sem o 15 anticorpo nas concentrações de 1 uM, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240 pM, 61 pM e 15 pM. As células foram cultivadas por 24 horas em 37 °C e 5 % de dióxido de carbono, lavadas com PBS frio, depois colhidas com tampão de lise (Pierce, 78505) de extrato de proteína de mamífero (MPER) contendo 150 mM de NaCl, 5 mM de pirofosfato de sódio, 10 uM de bpV 20 (phen), 50 uM de fenalarsina, 1 mM de ortovanadato de sódio, e coquetel inibidor da protease (Sigma, P714). Os lisados celulares foram diluídos duas vezes com albumina de soro bovino a 4 % em solução salina tamponada de fosfato com 0,1 % de Tween-20, depois analisados por ELISA com anticorpo de captura de ErbB3 anti-humano de camundongo e anticorpo de detecção 25 secundária de ErbB3 anti-humano de camundongo biotinilado. O sinal foi gerado com estreptavidina conjugada à peroxidase de raiz forte reagida com substrato quimioluminescente (Pierce, 37070). Os ELISAS foram observados com o uso de um luminímetro.

Como mostrado na Figura 4, Ab #6 reduziu os níveis totais de

ErbB3 em cerca de 46,9 % nas células MALME-3M *in vitro*, medido por ELISA. Meios não contendo nenhum soro nem anticorpo foram usados como controle.

Em uma outra experiência, a infrarregulação dos receptores de ErbB3 nas células MALME-3M com o uso de isótipos IgG1 e IgG2 de Ab# 6 foi examinada com o uso da análise FACS. As células MALME-3M foram tripsinizadas de um prato de 15 cm e lavadas uma vez com RPMI + 10 % de soro bovino fetal. As pelotas celulares foram recolocadas em suspensão em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células por mililitro. Duas alíquotas de  $2 \times 10^5$  células foram adicionadas a uma placa de cultura tecidual de 12 reservatórios e recolocadas em suspensão em um volume final de 800 ul de RPMI + 10 % de soro bovino fetal. A um reservatório, o isótipo de IgG1 de Ab #6 ou IgG2 de Ab #6 foi adicionado até uma concentração final de 100 nM (amostra tratada) e ao outro reservatório, um volume equivalente de PBS (amostra não tratada) foi adicionado.

No dia seguinte, as células tratadas e não tratadas foram tripsinizadas, lavadas e incubadas com 100 nM de Ab# 6 em tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. As células foram lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de coloração BD e incubadas com 100 ul de uma diluição a 1:500 de Alexa 647 anti-humano de cabra rotulado Alexa 647, por 45 minutos, sobre gelo. As células foram então lavadas e recolocadas em suspensão em 300 ul de tampão de coloração BD + 0,5 ug/ml de iodeto de propídio. A análise de 10.000 células foi feita em um citômetro de fluxo FACScalibur com o uso do canal FL4.

Como mostrado nas Figuras 5A e 5B, ambos os isótipos IgG1 e IgG2 de Ab# 6 regulados positivamente ErbB3 nas células MALME-3M em cerca de 62 % e em cerca de 66 %, respectivamente.

De modo a determinar se esta redução foi devida à internalização do receptor de ErbB3 sobre a superfície das células MALME-

3M, a expressão de ErbB3 na presença do anticorpo no decorrer do tempo foi medida. Especificamente, as células MALME-3M foram tripsinizadas de um prato de 15 cm e lavadas uma vez com RPMI + 10 % de soro bovino fetal. As pelotas celulares foram recolocadas em suspensão em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células por mililitro. Duas alíquotas de  $2 \times 10^5$  células foram adicionadas a uma placa de cultura tecidual de 12 reservatórios e recolocadas em suspensão em um volume final de 800  $\mu$ l de RPMI + 10 % de soro bovino fetal. A um reservatório, o anticorpo anti-ErbB3 foi adicionado até uma concentração final de 100 nM (amostra tratada) e ao outro reservatório, um volume equivalente de PBS (amostra não tratada) foi adicionado. No dia seguinte, as células tratadas e não tratadas foram tripsinizadas, lavadas e incubadas com 100 nM de anticorpo anti-ErbB3 em tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. As células foram lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de coloração BD e incubadas com 100  $\mu$ l de uma diluição a 1:500 de Alexa 647 anti-humano de cabra rotulado Alexa 647 por 45 minutos sobre gelo. As células foram então lavadas e recolocadas em suspensão em 300  $\mu$ l de tampão de coloração BD + 0,5  $\mu$ g/ml de iodeto de propídio. A análise das 10.000 células foi feita em um citômetro de fluxo FACScalibur com o uso do canal FL4.

Como mostrado na Figura 6, a infrarregulação do ErbB3 na presença de Ab #6 foi medida em 0 hora (Figura 6A), 0,5 hora (Figura 6B), 2 horas (Figura 6C) e 24 horas (Figura 6D). Como mostrado nas Figuras 6A a 6D, cerca de 50 % dos receptores de ErbB3 da superfície celular foram regulados negativamente após cerca de 30 minutos, e em cerca de 24 horas, cerca de 93 % dos receptores da superfície celular foram regulados negativamente.

A capacidade do Ab #6 de causar a infrarregulação do ErbB3 *in vivo* nas células de melanoma, foi também examinada como segue.

Resumidamente, camundongos nu/nu deficientes de células T

(camundongos fêmeas de 3 a 4 semanas de idade originados em NIH; híbrido; antecedentes albinos) foram comprados de Charles River Labs (Wilmington, MA). As células MALME-3M para implantação foram cultivadas em cultura (meios de RPMI, 10 % de FBS, L-glutamina e antibióticos, 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) até cerca de 80 % de confluência antes da colheita. As células foram mantidas sobre gelo até a implantação. Os camundongos foram implantados através de injeção subcutânea com 100 ul de células MALME-3M sobre o flanco direito e deixados recuperar-se ao mesmo tempo em que eram monitorados quanto ao crescimento tumoral inicial.

Os tumores foram medidos (comprimento pela largura) por calibre digital e os camundongos foram dosados com IgG2a (Sigma, M7769-5MG) por injeção intravenosa. Os camundongos foram dosados intraperitonealmente em dias alternados ou com 15 µg ou com 100 µg de anticorpo número 6, e os tumores foram medidos três vezes por semana e registrados em uma planilha EXCEL da Microsoft.

As medições tumorais finais (L x W) foram determinadas, os camundongos foram submetidos a eutanásia por asfixia de CO<sub>2</sub> e os tumores foram excisados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido, e foram armazenados em -80 °C (para a análise bioquímica). As medições finais dos tumores foram analisadas e representadas graficamente por área tumoral e volume tumoral, como descrito, por exemplo, em Burtrum *et al.*, (2003) *Cancer Res.*, 63: 8912-8921. Os dados foram também analisados por meios “normalizados” e “não normalizados” tanto quanto ao volume tumoral quanto à área tumoral. Quanto à “normalização” dos dados, em cada ponto do tempo de medição, cada tumor em cada grupo foi dividido pelo tamanho inicial do tumor determinado por medição de calibre.

Como mostrado na Figura 7, entre os vários anticorpos testados neste ensaio, Ab #6 causou a infrarregulação do ErbB3 total tão cedo quanto 24 horas após a injeção nos tumores tratados ou com o isótipo IgG1 ou

com o IgG2 de Ab #6). O PBS foi usado como um controle.

Em uma outra experiência, a capacidade do Ab #6 de infrarregular ErbB3 em xenoenxertos ADRr *in vivo* foi examinada.

Resumidamente, as amostras foram pulverizadas em um criopulverizador (Covaria Inc.). Os tumores foram armazenados em sacos especiais (pré-pesados antes da adição do tumor) e colocados em nitrogênio líquido enquanto eram manipulados. Quanto aos pequenos tumores, 200 µl de tampão de Lise foram primeiro adicionados ao saco com o tumor, congelados em nitrogênio líquido e então pulverizados para melhorar a recuperação do tumor do saco. Os tumores pulverizados foram transferidos para tubos Eppendorf de 2 ml e colocados em nitrogênio líquido até que lisados. Os tumores foram lisados em tampão de lise suplementado com inibidores da protease e da fosfatase. O Tampão de Lise foi adicionados às alíquotas de tumores em uma concentração final de 62,5 mg/ml. As amostras de tumores foram homogeneizadas por turbilhonamento por 30 segundos e deixando-as repousarem sobre gelo por 30 minutos. Os lisados foram centrifugados por 10 minutos em colunas Qiagen Qiashredder para outra homogeneização das amostras. Os lisados purificados foram divididos em alíquotas em tubos novos.

O ensaio de BCA foi realizado como apresentado na seção de materiais e métodos supra.

Os níveis totais de ErbB3 foram determinados por ELISA. Os reagentes de ELISA foram comprados da R&D Systems como kits Duoset. Placas Nunc Maxisorb de 96 reservatórios foram revestidas com 50 µl de anticorpo de captura respectivo e incubadas durante a noite na temperatura ambiente. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas por 3 vezes com 1000 µl/reservatório em uma lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20) e depois bloqueadas por 1 hora na temperatura ambiente com 2 % de BSA em PBS. As placas foram então lavadas por três vezes com 1000

μl/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Os lisados (50 μl) e padrões foram diluídos em tampão de Lise a 50 % e 1 % de BSA; todas as amostras foram desenvolvidas em duplicata. As placas foram incubadas por 2 horas em 4 °C sobre um agitador de placas e depois 5 lavadas por 3 vezes com 1000 μl/reservatório em uma lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Cinquenta microlitros de anticorpo de detecção diluído em BSA a 2 %, PBST foi adicionado e as placas foram incubadas por 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram lavadas por três vezes com 1000 μl/reservatório na lavadora de placas BioTek com PBST 10 (0,05 % de Tween-20). Cinquenta microlitros de Estreptavidina-HRP foram adicionados e as placas foram incubadas por 30 minutos na temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 1000 μl/reservatório em uma lavadora de placas BioTek com PBST (0,05 % de Tween-20). Cinquenta microlitros de substrato de ELISA Supersignal Pico 15 foram adicionados e a leitura foi realizada em uma leitora de placas Fusion. Os dados foram analisados com o uso de EXCEL. As amostras em duplicata foram apuradas em média e as barras de erros representam o desvio padrão entre as duas réplicas.

Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 8. 20 Como mostrado na Figura 8, ErbB3 regulado negativamente Ab #6 em xenoenxertos de ADRr *in vivo*.

#### EXEMPLO 6

#### INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR TUMORAL

A capacidade do Ab #6 de inibir a proliferação celular das 25 células que expressam ErbB3 (por exemplo, as células do câncer) foi examinada como segue.

Células MALME3M, ACHN e NCI/ADRr foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 reservatórios e cultivadas em meios RPMI-1640 suplementado com antibióticos, L-glutamina 2 mM e 10 % de soro

bovino fetal (FBS) por 24 horas em 37 graus Celsius e 5 % de dióxido de carbono. Os meios foram então mudados para meios de RPMI-1640 com antibióticos, L-glutamina 2 mM e com e sem o anticorpo nas concentrações de 1 uM, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240 pM, 61 pM e 15 pM.

5 As células foram cultivadas por 96 horas em 37 °C e 5 % de dióxido de carbono, depois colhidas com o Ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo® (Promega, G7573) e analisadas em um luminímetro. Meios não contendo nenhum soro nem anticorpo foram usados como controle.

10 Como mostrado nas Figuras 9, 10 e 11, Ab #6 inibiu a proliferação das células MALME-3M (Figura 9), das células do câncer ovariano ADRr (Figura 10) e das células ACHN (Figura 11) que expressam ErbB3. Especificamente, Ab #6 inibiu a proliferação das células MALME-3M em cerca de 19,6 %, medida com o uso do ensaio Cell Titer Glow, e inibiu a proliferação das células de câncer ovariano ADRr em cerca de 30,5 %.

15 Igualmente, como mostrado na Figura 11, Ab #6 inibiu a proliferação das células ACHN em cerca de 25,4 %.

#### EXEMPLO 7

#### INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE ErbB3 NAS CÉLULAS TUMORAIS

20 A capacidade do Ab #6 de inibir a fosforilação de ErbB3 *in vivo* foi examinada como segue.

As amostras foram pulverizadas com o uso da técnica descrita no exemplo 5 acima, em relação à Figura 8. O ensaio BCA foi realizado como apresentado na seção Materiais e Métodos acima, e o ensaio ELISA foi realizado como descrito no Exemplo 5 acima em relação à Figura 8.

25 Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 12. Como mostrado na Figura 12, Ab #6 inibiu significativamente a fosforilação de ErbB3 nos xenoenxertos ovarianos ADRr *in vivo*, medido pela quantidade de ErbB3 fosforilado (pErbB3) em ng/mg da proteína total.

A capacidade do Ab #6 para inibir a fosforilação de ErbB3

induzida pela betacelulina (BTC) ou a herregulina (HRG) foi também examinada, como segue.

Células ADRr ovarianas foram pré-incubadas com Ab #6 por 30 minutos antes da estimulação com 50 mM de BTC, 10 mM de HRG ou 5 333 nM de TGF- $\alpha$ .

Células ADRr ovarianas foram pré-incubadas com Ab #6 por 30 minutos antes da estimulação com 50 mM de BTC, 10 mM de HRG ou 333 nM de TGF- $\alpha$ . Em seguida à pré-incubação, os meios foram removidos e as células foram estimuladas por 5 minutos em 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> com 50 10 nM de BTC ou 333 nM de TGF- $\alpha$  (para PE498). Os controles de HRG (5 minutos, 5 nM), 10 % de soro e 0 % dos controles do soro foram também usados. As células foram lavadas com 1X PBS frio e lisadas em 30  $\mu$ l de tampão de lise frio [tampão M-PER mais vanadato de sódio (NaVO<sub>4</sub>, Sigma), 2-glicerofosfato, óxido de fenilarsina, BpV e inibidores da protease] mediante 15 incubação sobre gelo por 30 minutos. Os lisados foram armazenados durante a noite em -80 °C.

Como mostrado nas Figuras 13A a 13C, Ab #6 inibiu significativamente a fosforilação de ErbB3 tanto mediada pela betacelulina quanto pela herregulina.

20 Em uma outra experiência, a capacidade da Ab #6 para inibir a fosforilação de ErbB3 nas linhagens celulares do tumor ovariano OVCAR 5 e OVCAR 8, foi examinada como segue.

As linhagens celulares OVCAR 5 e OVCAR 8 foram obtidas do National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment and Diagnostics 25 ("DCTD"). O ELISA foi realizado como descrito na seção de Materiais e Métodos acima.

Os resultados desta experiência são apresentados nas Figuras 14A e 14B. Como apresentado nas Figuras 14A e 14B, Ab #6 inibiu a fosforilação de ErbB3 tanto na linhagem celular do câncer ovariano OVCAR

5 quanto na OVCAR 8.

Como examinado acima, Ab #6 inibe a fosforilação do ErbB3 mediada pela betacelulina. A fim de pesquisar se a fosforilação do ErbB3 mediada pela betacelulina ocorre através de ErbB1 ou de ErbB3, a seguinte 5 experiência foi realizada.

Células ADRr ou células MALME-3M ( $1 \times 10^5$ ) foram pré-incubadas com 25  $\mu\text{M}$  de Ab #6 anti-ErbB3 ou 25  $\mu\text{M}$  de Erbitux (como controle) em 50  $\mu\text{l}$  tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. Após 10 os 30 minutos, 50  $\mu\text{l}$  de BTC biotinilado 400 nM foram adicionados às células e incubadas por outros 30 minutos sobre gelo. Isto deu uma concentração final de 12,5  $\mu\text{M}$  de anticorpos e 200 mM de BTC. As células foram então lavadas duas vezes com 500  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD e incubadas com 15 100  $\mu\text{l}$  de uma diluição de estreptavidina-PE a 1:200 (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) em tampão de coloração BD por 45 minutos. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em 300  $\mu\text{l}$  de 20 tampão de coloração BD e analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur. Como um controle positivo,  $1 \times 10^5$  de células ADRr ou MALME-3M foram incubadas com 200 nM de BTC por 30 minutos sobre gelo, lavadas duas vezes e incubadas com uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE por 45 25 minutos. Para avaliar a coloração de fundo do conjugado de estreptavidina-PE, as células foram incubadas com 100  $\mu\text{l}$  de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE apenas por 45 minutos.

Os resultados desta experiência são apresentados nas Figuras 15A a 15C. Como mostrado na Figura 15A, a betacelulina (BTC) não 25 apresenta qualquer ligação apreciável às células MALME-3M negativas de ErbB1. Entretanto, como apresentado nas Figuras 15B e 15C, a BTC apresenta ligação às células ADRr positivas de ErbB1.

Igualmente, como mostrado nas Figuras 15B e 15C, esta ligação foi bloqueada por Erbitux, que é um anticorpo anti-EGFR que

especificamente se liga a EGFR e foi incluído como um controle para demonstrar que os ligando como EGF se ligam a EGFR, e o que é descrito, por exemplo, em Adams *et al.* (2005), *Nature Biotechnology* 23, 1147-1157.

#### EXEMPLO 8

5 INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA HERREGULINA NAS CÉLULAS TUMORAIS

A capacidade do Ab #6 de inibir a sinalização das células tumorais mediada pela herregulina foi pesquisada como segue.

Células MALME-3M foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 reservatórios, e cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos, L-glutamina 2 mM e 10 % de soro bovino fetal (FBS) por 24 horas em 37 °C e 5 % de dióxido de carbono. As células foram privadas de soro em meio RPMI-1640 com antibióticos e L-glutamina 1 mM por 24 horas em 37 °C e 5 % de dióxido de carbono. As células foram pré-tratadas com e sem o anticorpo anti-ErbB3 (isótipo IgG2 de Ab #6) nas concentrações de 1  $\mu$ M, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240 pM e 61 pM por 30 minutos, depois estimuladas com HRG1-beta1-ECD por 10 minutos em 37 °C, e 5 % de dióxido de carbono. As células foram lavadas com PBS frio, depois colhidas com tampão de lise (Pierce, 78505) de extrato protéico de mamífero (MPER) contendo NaCl 150 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, bpV 10 uM (phen), fenalarsina 50  $\mu$ M, ortovanadato de sódio 1 mM, e coquetel inibidor da protease (Sigma, P714). Os lisados celulares foram diluídos duas vezes com 4 % de albumina de soro bovino em solução salina tamponada de fosfato com 0,1 % de tween-20, depois analisados por ELISA quanto a AKT (um efetor de jusante de ErbB3) e fosforilação de ErbB3.

De modo a testar quanto à fosforilação de AKT, os lisados foram desenvolvidos em uma placa de ELISA com um anticorpo de captura específico para AKT e anticorpo biotinilado de detecção específico para o sítio de fosforilação na serina 473 de AKT. O sinal foi gerado com

estreptavidina conjugada à peroxidase de raiz forte reagida com substrato quimioluminescente (Pierce, 37070). De modo a ensaiar quanto à fosforilação de ErbB3, os lisados foram desenvolvidos em uma placa de ELISA com um anticorpo de captura específico para ErbB3 e um anticorpo de detecção 5 antifosfotirosina conjugado à peroxidase de raiz forte. Esta foi então reagida com substrato quimioluminescente (Pierce, 37070). Os ELISAs foram visualizados com o uso de luminímetro.

Como mostrado nas Figuras 16A e 16B, o Ab #6 foi um potente inibidor da sinalização mediada pela herregulina nas células 10 MALME-3M, medida pela fosforilação reduzida do ErbB3 (Figura 16A) e AKT (Figura 16B). Notavelmente, o Ab #6 inibiu a fosforilação do AKT em quase 100 %.

#### EXEMPLO 9

#### INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TUMORES OVARIANOS, 15 PROSTÁTICOS E PANCREÁTICOS

Para avaliar a eficácia do Ab #6 *in vivo*, vários modelos de xenoenxertos de câncer humano foram estabelecidos em camundongos desnudos e a inibição do crescimento tumoral foi avaliada em doses múltiplas. Por exemplo, os camundongos nu/nu deficientes de células T (camundongos 20 fêmeas de 3 a 4 semanas de idade originados em NIH; híbridos; antecedentes albinos) foram comprados de Charles River Labs (Wilmington, MA), para estudos de xenoenxertos. As células ADRr para implantação foram cultivadas em cultura (meios de RPMI, 10 % de FBS, L-glutamina e antibióticos, 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) até cerca de 85 % de confluência antes da colheita. As células 25 foram mantidas sobre gelo até a implantação. Os camundongos foram implantados através de injeção subcutânea com 100 µl de células ADRs sobre o flanco direito e deixados recuperar-se ao mesmo tempo em que eram monitorados quanto ao crescimento tumoral inicial.

Os tumores foram medidos (comprimento pela largura) por

calibre digital e os camundongos foram dosados com IgG2a (Sigma, M7769-5MG) por injeção intravenosa. Os camundongos foram dosados intraperitonealmente de três em três dias ou com 30  $\mu$ g ou com 300  $\mu$ g de Ab #6, e os tumores foram medidos três vezes por semana e registrados em uma 5 planilha EXCEL da Microsoft.

As medições tumorais finais (L x W) foram determinadas, os camundongos foram submetidos a eutanásia por asfixia de CO<sub>2</sub> e os tumores foram excisados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido, e foram armazenados em -80 °C (para a análise bioquímica). As medições finais dos 10 tumores foram analisadas e representadas graficamente por área tumoral e volume tumoral, como descrito, por exemplo, em Burtrum *et al.*, acima. Os dados foram também analisados por meios “normalizados” e “não normalizados” tanto quanto ao volume tumoral quanto à área tumoral. Quanto à “normalização” dos dados, em cada ponto do tempo de medição, cada tumor 15 em cada grupo foi dividido pelo tamanho inicial do tumor determinado por medição de calibre.

Os dados de três diferentes modelos derivados das linhagens celulares de tumores humanos, ADRr (ovarianos), Du145 (próstata) e OvCAR8 (ovarianos) são mostrados nas Figuras 17A a C, e o estudo de 20 xenoenxerto Colo357 é mostrado na Figura 17D. Os dados destes estudos demonstraram que uma dose de 300 ug de Ab #6 a cada três dias (Q3d) resulta em inibição significativa do crescimento tumoral ( $p < 0,05$  para pontos do tempo múltiplos durante os estudos). Além disso, este efeito inibidor do Ab #6 foi ainda elevado quando a dose foi aumentada até 600 ug, Q3d, no 25 modelo de câncer prostático Du145, bem como em um modelo renal e um xenoenxerto de carcinoma pancreático (ACHN e COLO357). Entretanto, outra elevação da dose para 1500 ug de Q3d não resultou em eficácia aumentada (OvCAR8-Figura 17; COLO357), sugerindo que os 600 ug é saturação em relação à inibição do crescimento tumoral. As análises

farmacocinéticas (PK) do soro dos animais destes estudos demonstram um aumento dependente da dose, na retenção sérica do Ab #6. De forma semelhante, a análise bioquímica dos níveis intratumorais do Ab #6 destes estudos diferentes mostrou uma faixa dependente da dose de 0 a -6 pg de 5 MM121/ug do lisado tumoral total (dados não mostrados).

#### EXEMPLO 10

#### INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DOS LIGANDOS DE ErbB3 AO ErbB3 NAS CÉLULAS TUMORAIS

Em uma outra experiência, a especificidade dos anticorpos da 10 invenção para inibir a ligação dos ligandos de ErbB3 ao ErbB3, e não dos ligandos semelhantes do EGF ao EGFR, foi pesquisado como segue.

Em uma experiência, a especificidade do Ab #6 e uma versão de Fab do Ab #3 (Ab/Fab #3) para inibir a ligação dos ligandos de ErbB3 (por exemplo, a herregulina e a epirregulina) ao ErbB3, foi pesquisada.

15 De modo a pesquisar a capacidade do Ab #6 e do Ab/Fab #3 de inibir a ligação da herregulina ao ErbB3, a seguinte experiência foi realizada.

Células ADRr ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de um 20 anticorpo anti-ErbB3 (por exemplo, Ab #6 ou Ab/Fab #3) em 50  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. Após os 30 minutos, 50  $\mu\text{l}$  de EGF de herregulina biotinilada a 40 nM foram adicionados às células e incubados por outros 10 minutos sobre gelo. Isto deu uma concentração final de 5  $\mu\text{M}$  de anticorpo e de 20 nM de EGF de herregulina. As células foram 25 então lavadas por duas vezes com 500 ml de tampão de coloração BD e incubadas com 100  $\mu\text{l}$  de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) em tampão de coloração BD por 45 minutos. Finalmente, as células foram lavadas por duas vezes, recolocadas em suspensão em 300  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD e analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur. Como um controle positivo,  $1 \times 10^5$  células

de ADRr foram incubadas com EGF de herregulina 20 nM por 10 minutos sobre gelo, lavadas duas vezes e incubadas com uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE por 45 minutos. De modo a avaliar a coloração de fundo do conjugado de estreptavidina-PE,  $1 \times 10^5$  células de ADRr foram incubadas 5 com 100  $\mu$ l de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE apenas por 45 minutos.

Os resultados desta experiência são apresentados nas Figuras 18A e 18B. Como apresentado nas Figuras 18A e 18B, tanto Ab #6 quanto Ab/Fab #3 foram capazes de inibir a ligação da herregulina ao ErbB3.

10 De forma semelhante, a capacidade do Ab #6 de inibir a ligação de outro ligando de ErbB3, e epirregulina, ao ErbB3, foi examinada como segue.

15 Células ADRr ( $1 \times 10^5$ ) foram pré-incubadas com 25  $\mu$ M de Ab #6 ou 25  $\mu$ M de Erbitux (como controle) em 50  $\mu$ l de tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. Após 30 minutos, 50  $\mu$ l de Epi biotinilado 2  $\mu$ M foram adicionados às células e incubados por outros 30 minutos sobre gelo. Isto deu uma concentração final de 12,5  $\mu$ M de anticorpos e 1  $\mu$ M de Epi. As células foram então lavadas duas vezes com 500  $\mu$ l de tampão de coloração BD e incubadas com 100  $\mu$ l de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) em tampão de coloração BD por 45 minutos. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em 300  $\mu$ l de tampão de coloração BD e analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur. Como um controle positivo,  $1 \times 10^5$  células ADRr foram incubadas com 1  $\mu$ M de Epi por 30 minutos sobre gelo, 20 lavadas duas vezes e incubadas com uma diluição de 1:200 de estreptavidina-PE por 45 minutos. Para avaliar o manchamento de fundo do conjugado de estreptavidina-PE, as células foram incubadas com 100  $\mu$ l de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE apenas por 45 minutos.

25 Os resultados desta experiência são apresentados nas Figuras

19A e 19B. Como mostrado na Figura 19A, a epirregulina se liga às células ADR<sup>r</sup> positivas do ErbB3. Além disso, como mostrado na Figura 19B, esta ligação é inibida tanto por Erbitux quanto pelo Ab #6, sugerindo que a epirregulina pode ligar-se tanto a EGFR quanto ao ErbB3.

5 Uma outra experiência foi realizada para pesquisar se o Ab #6  
é capaz de inibir a ligação de um ligando semelhante ao EGF (por exemplo,  
HB-EGF) às células tumorais

Células ADRr ( $1 \times 10^5$ ) foram pré-incubadas com 25  $\mu\text{M}$  de Ab #6 ou 25  $\mu\text{M}$  de Erbitux (como controle) em 50  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD por 30 minutos sobre gelo. Após 30 minutos, 50  $\mu\text{l}$  de HB-EGF biotinilado 400 nM foram adicionados às células e incubados por outros 30 minutos sobre gelo. Isto deu uma concentração final de 12,5  $\mu\text{M}$  de anticorpos e 200 nM de HB-EGF. As células foram depois lavadas duas vezes com 500  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD e incubadas com 100  $\mu\text{l}$  de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) em tampão de coloração BD por 45 minutos. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em 300  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD e analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur. Como um controle positivo,  $1 \times 10^5$  células ADRr foram incubadas com 200 nM de HB-EGF por 30 minutos sobre gelo, lavadas duas vezes e incubadas com uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE por 45 minutos. Para avaliar o manchamento de fundo do conjugado de estreptavidina-PE, as células foram incubadas com 100  $\mu\text{l}$  de uma diluição a 1:200 de estreptavidina-PE apenas por 45 minutos.

25 Como mostrado nas Figuras 20A e 20B, HB-EGF se liga ao  
ErbB nas células ADRr e o Ab #6 não inibe esta ligação, evidenciando que o  
Ab #6 é específico para inibir a ligação dos ligandos de ErbB3 (por exemplo,  
herregulina e epirregulina) ao ErbB3.

### EXEMPLO 11

## INIBIÇÃO DA SECREÇÃO DE VEGF NAS CÉLULAS TUMORAIS

A capacidade do Ab #6 para inibir a secreção de VEGF das células que expressam ErbB3 (por exemplo, células de câncer), foi examinada com o uso do ensaio de secreção de VEGF (kit de BEGF ELISA disponível da R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. DY293B). Primeiramente, a capacidade do Ab #6 de inibir a secreção de VEGF nas células MCF-7, T47D e COLO-357 não tratadas e tratadas com HRG-beta1, foi analisada. Estes estudos revelaram que COLO-357 secretou a mais elevada quantidade de VEGF no meio. Como estas células também tinham níveis muito elevados de HRG (dados não mostrados), a adição de HRG ao meio não foi capaz de ainda induzir a secreção de VEGF (Figura 24A). Ao contrário, o HRG foi capaz de induzir a secreção de VEGF nas células MCF-7 e T47D.

Ab #6 apresenta um efeito inibidor potente em altos níveis em todas as três linhagens celulares com o mais elevado sendo no COLO-357 (Figura 24A). Ab #6 também apresentou um efeito similar *in vivo* por inibir a secreção de VEGF em três diferentes xenoenxertos, o mais elevado sendo no xenoenxerto de COLO-357 (Figura 24B). A inibição do VEGF se correlaciona com a inibição da fosforilação do ErbB3 (Figura 24C). A inibição da secreção do VEGF também se correlaciona com a inibição da angiogênese das células tumorais. Em particular, foi identificado que os fatores secretados de células de mieloma, tais como VEGF e bFGF, deflagram a angiogênese (ver, por exemplo, Leung *et al.* (1989) *Science* 246(4935): 1306-1309; Yen *et al.* (2000) *Oncogene* 19(31): 3460-3469).

### EXEMPLO 12

#### 25 INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

A capacidade do Ab #6 de inibir a migração das células que expressam ErbB3 (por exemplo, células MCF-7) foi examinada com o uso do ensaio trans-reservatório (Millipore Corp., Billerica, MA, Cat. ECM552). Primeiro, as células MCF-7 foram privadas de soro durante a noite e depois

incubadas na presença ou ausência de Ab #6 (concentração final de 8 uM) por 15 minutos na temperatura ambiente. As células foram então transferidas para uma câmara superior que é separada de uma câmara inferior por uma membrana revestida de colágeno tipo I, através da qual as células podem 5 migrar. 10 % de FBS foram adicionados ao meio na câmara inferior para atuar como um quimioatraente na presença ou ausência de Ab #6. As câmaras foram incubadas em 37 °C por 16 horas, e depois as células que migraram através da membrana foram removidas com o uso de um tampão de remoção e incubadas com um corante fluorescente de ligação celular. A fluorescência 10 foi quantificada com o uso de uma leitora de placas fluorescentes. A fluorescência média ± SEM (n = 2) é apresentada na Figura 25.

Como mostrado na Figura 25, 10 % de FBS estimula a migração celular (coluna 3) em comparação com o controle não tratado (coluna 1) e Ab #6 de 8 uM inibe a migração das células induzidas por FBS 15 (coluna 4).

### EXEMPLO 13

#### INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO ESFERÓIDE

A capacidade do Ab #6 de inibir o crescimento esferóide das células que expressam ErbB3 foi examinada com o uso de um ensaio que 20 aproxima as condições de um crescimento tumoral em desenvolvimento (Herman *et al.* (2007) *Journal of Biomolecular Screening Electronic publication*). os esferóides de AdrR e DU145 foram iniciados em uma frequência de 1 esferóide por reservatório de uma placa de 96 reservatórios, com o uso do método de suspensão (Herrman *et al.*, 2008). Esferóides 25 individuais foram então tratados ou com Ab #6 (concentração final de 8 uM), domínio EGF de Herregulina-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. 396-BB, concentração final de 3,4 nM), ou uma combinação de ambos, como indicado. Os diâmetros dos esferóides foram medidos com o uso de microscopia óptica (objetiva de 10X) no dia 1 e no dia 13.

Ab #6 inibe o crescimento esferóide nas células AdrR (Figura 26A). Além disso, HRG 3,4 nM estimula o crescimento esferóide e Ab #6 inibe o efeito de HRG (Figura 26B). Os esferóides derivados de DU145 não aumentaram de tamanho durante 13 dias da experiência; entretanto, o crescimento foi significativamente estimulado por HRG1-beta 1. Nestas células, 8 uM de Ab #6 inibe o crescimento esferóide induzido por HRG (Figura 26C).

#### EXEMPLO 14

#### INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO

A capacidade do Ab #6 de inibir a sinalização induzida por diferentes ligandos foi examinada. Por exemplo, o efeito do Ab #6 sobre HRG e BTC ligando-se às células AdrR expressando o receptor de ErbB3 foi testado. Como mostrado nas Figuras 27A e B, usando a análise de FACS, o Ab #6 compete com HRG e não com BTC para ligação às células AdrR. Consequentemente, o bloqueio por Ab #6 da ligação do HRG ao ErbB3 deve prevenir a sinalização induzida por HRG.

Adicionalmente, vários ligandos foram testados para indução da fosforilação de ErbB3. Três ligandos, HRG, BTC e HGF, foram capazes de estimular a fosforilação induzida pelo ErbB3 nas células AdrR, enquanto EGF não o foi. Como mostrado na Figura 28, Ab #6 inibe a fosforilação de pErbB3 induzida por HGF nas células AdrR (Figura 28). Além disso, como conhecido na técnica (ver, por exemplo, Wallenius *et al.* (2000) *Am J Pathol.* 156 (3): 821-829 10702398), a sinalização intensificada de HGF foi observada em vários tumores epiteliais e não epiteliais.

#### INTERAÇÃO DE ErbB3 E O PAPEL DE Ab #6 EM MODULAR ESTA INTERAÇÃO

Foi observado que os cânceres pulmonares de células não pequenas, carregando mutações de ativação no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), desenvolvem resistência aos inibidores da

5 tirosina quinase mediante o recrutamento de MET e HER3 e, assim, a ativação da via de sobrevivência celular de PI3K-AKT (Engelmann *et al.* (2007) *Science* 316: 1039-1043; Gou (2007) *PNAS*: 105(2): 692-697). A associação entre EGFR e c-MET nas linhagens celulares que carregam mutações de EGFR de ativação foi bem estabelecida por co-imunoprecipitação (Engelmann *et al.* 2007; Gou 2007). Guo *et al.* recentemente demonstrou que c-MET e ErbB3 também existe em um complexo em uma linhagem celular gástrica MKN45 conhecida como sendo dependente de c-MET amplificado, com o uso da co-imunoprecipitação.

10 Esta interação de c-MET-ErbB3 ocorre também nas células AdrR carregando o EGFR do tipo selvagem e não é dependente de c-MET amplificado. O HGF (Fator de Crescimento de Hepatócito) induz a fosforilação do ErbB3 nas células AdrR de uma maneira dependente da dose, como mostrado na Figura 28. Além disso, Ab #6 inibe a fosforilação de erbB3  
15 induzida pelo HGF.

20 O efeito de HRG e BTC na fosforilação tanto do ErbB1 quanto do ErbB3 também foi pesquisado, e o HRG e o BTC foram observados induzirem a fosforilação tanto do ErbB1 quanto do ErbB3. I HRG foi observado ser um indutor mais potente da fosforilação do ErbB3, enquanto o BTC foi um indutor potente da fosforilação do ErbB1 (Figura 29). Esta fosforilação é provável de ser conduzida pelo complexo entre ErbB1 e ErbB3. Resumidamente, a ligação de HRG ao ErbB3 induz a formação do complexo entre ErbB1 e ErbB3, levando à ativação de ambos os receptores. O mesmo fenômeno parece provável para o BTC, onde a ligação do BTC ao ErbB1 estimula a formação do complexo entre ErbB1 e ErbB3, levando à fosforilação tanto do ErbB1 quanto do ErbB3.

**A INIBIÇÃO DO LIGANDO DE ANTICORPO (HRG, BTC, EGF E HGF)  
ESTIMULOU A FOSFORILAÇÃO DO ErbB3**

A capacidade do Ab #6 de inibir a fosforilação do ErbB3

induzida pelo ligando (HRG, BTC, EGF e HGF) foi examinada com base no seguinte método:

5 1. Células AdrR foram plaqueadas em placa de 96 reservatórios em uma densidade de 30.000 células/reservatório/100 ul em meio RPMI contendo 10 % de FBS e deixadas em cultivo durante a noite;

2. No dia seguinte, as células foram privadas de soro pela mudança do meio em meio livre de FBS e deixadas em cultivo durante a noite;

10 3. As células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de Ab #6 (de 0,01 nM a 100 nM), ou tampão (controle), por duas horas;

4. As células foram depois estimuladas com 10 nM de HRG e HGF por 10 minutos, ou 10 nM de BTC e EGF por 5 minutos;

5. A reação foi interrompida pela remoção do meio de cultura e lavagem das células uma vez com PBS gelado;

15 6. As células foram então lisadas em Tris 25 mM, pH +7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1,0 % de Triton X-100, 1,0 % de CHAPS, 10 % v/v de glicerol, contendo 1X o inibidor da protease e 1X o inibidor da fosfatase; e

20 7. A fosforilação do ErbB3 foi medida nos lisados celulares com o uso do kit ELISA de Fosfo-ErbB3 Humano (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. nº DYC1769) de acordo com as instruções do fabricante.

INIBIÇÃO DE ANTICORPO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO PROTÉICO DE ErbB2-ErbB3

25 Células AdrR foram pré-incubadas com tampão (controle), ou Ab #6 250 nM por 60 minutos na temperatura ambiente, depois tratadas com HRG 10 nM ou BTC 10 nM ou tampão de controle, por 10 minutos. As células foram lisadas em Tris 25 mM, pH +7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1,0 %, 1,0 % de CHAPS, 10 % v/v de glicerol, contendo PMSF 0,2 mM, 50 mTU/ml de aprotinina, e 100 uM de leupeptina e o lisado bruto foram centrifugados rapidamente para remover o material insolúvel. O

sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf, e o anticorpo anti-ErbB3 (Santa Cruz sc-285) foi adicionado na solução a 1:500. Os sobrenadantes foram incubados durante a noite com agitação suave em 4 °C. 5 60 ul de contas de agarose de Proteína A/G Imobilizadas (Pierce, Rockford, IL, Cat. 20421) foram primeiro lavadas com 1X PBS. A mistura de lisado celular-anticorpo foi adicionada às contas lavadas com PBS, e incubada por 2 horas com agitação suave em 4 °C. Os imunoprecipitados foram então lavados com tampão de lise gelada por 3 vezes, recolocados em suspensão em 30 ul de tampão de amostra de 2X SDS, desnaturados pelo calor em 95 °C por 7 minutos e 10 desenvolvidos em 4 a 12 % de Géis de Bis-Tris. SDS-PAGE e eletrotransferidos para membrana de PVDF em tampão de Tri-Glicina com 10 % de MeOH. A membrana foi bloqueada por 1 hora em 10 ml de tampão de bloqueio (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Cat. 927-40000) e depois incubada com o anticorpo anti-ErbB2 em 1:1000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Cat. 29D8) em 15 10 ml de tampão de bloqueio (Li-Cor Biosciences, Cat. 927-40000). O sinal foi detectado com o uso de IRDye800 anticoelho de cabra em 1:5000 (2 ul) em 10 ml de tampão de bloqueio (Li-Cor Biosciences, Cat. 927-40000).

Ab #6 foi também mostrado inibir completamente a formação do complexo de ErbB2/3 estimulado por HRG (Figura 29B).

20 **EQUIVALENTES**

Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar, com o uso de não mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes das formas de realização específicas da invenção aqui descritas. Qualquer combinação das formas de realização apresentadas nas reivindicações 25 dependentes é considerada situar-se dentro do escopo da invenção.

**INCORPORAÇÃO COMO REFERÊNCIA**

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes pendentes aqui referidos ficam por este meio aqui incorporados como referência em sua totalidade.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.  
 <120> ANTICORPOS CONTRA ERBB3 E USOS DOS MESMOS  
 <130> MMJ-001PC  
 <140> PCT/US2008/002119  
 <141> 2008-02-15  
 <150> 60/901,904  
 <151> 2007-02-16  
 <150> 61/009,796  
 <151> 2008-01-02  
 <160> 53  
 <170> PatentIn Ver. 3.3  
 <210> 1  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota="Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 1  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
     1                  5                 10                 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
     20                 25                                 30  
 Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
     35                 40                         45  
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu 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  
 Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
     100                 105                         110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
     115  
 <210> 2  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota="Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 2  
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
     1                  5                 10                 15  
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr  
     20                 25                                 30  
 Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
     35                 40                         45  
 Ile Ile Tyr Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
     50                 55                         60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
     65                 70                         75                 80  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser  
     85                 90                         95  
 Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
     100                 105                         110  
 <210> 3

<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota="Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 3  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
     1              5              10              15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr  
     20              25              30  
 Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
     35              40              45  
 Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
     50              55              60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
     65              70              75              80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
     85              90              95  
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
     100            105            110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
     115  
 <210> 4  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 4  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
     1              5              10              15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn  
     20              25              30  
 Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
     35              40              45  
 Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Ser  
     50              55              60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
     65              70              75              80  
 Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu  
     85              90              95  
 Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
     100            105            110  
 <210> 5  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 5  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
     1              5              10              15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr  
     20              25              30  
 Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
     35              40              45  
 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys 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 Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 6  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Polipeptídeo sintético"  
 <400> 6  
 Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Tyr Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr  
 35 40 45  
 Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"  
 <400> 7  
 His Tyr Val Met Ala  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"  
 <400> 8  
 Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"  
 <400> 9  
 Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 10

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Val Val Ser  
1 5 10

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 11

Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 12

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Phe Val Ile  
1 5 10

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 13

Ala Tyr Asn Met Arg  
1 5

<210> 14  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 14

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

Gly

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 15

Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5  
<210> 16  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 16

Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Ile Tyr  
1 5 10  
<210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 17

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5  
<210> 18  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 18

Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val  
1 5 10  
<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 19

Ala Tyr Gly Met Gly  
1 5  
<210> 20  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 20

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

<210> 21  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:

Peptídeo sintético"

<400> 21

Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"

<400> 22

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val Ser  
 1 5 10

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"

<400> 23

Tyr Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Peptídeo sintético"

<400> 24

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val  
 1 5

<210> 25

<211> 357

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Polinucleotídeo sintético"

<400> 25

gaggtgcagc tgctggagag cggcggaggg ctggccagc caggcggcag cctgaggctg 60  
 tcctgcgccg ccagcggctt caccctcagc cactacgtga tggctgggt gcggcaggcc 120  
 ccaggcaagg gccttggatg ggtgtccagc atcagcagca gcggcggctg gaccctgtac 180  
 gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagccttag ggcggaggac accggcgtgt actactgcac caggggcctg 300  
 aagatggcca ccatttcga ctactgggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc 357

<210> 26

<211> 333

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
 Polinucleotídeo sintético"

<400> 26

cagtccggccc tgacccagcc cgccagcgtg agcggcagcc cagggcagag catcaccatc 60  
 agctgcacccg gcaccagcag cgacgtggc agctacaacg tggtgtccctg gtatcagcag 120  
 caccggca aggcccccaa gctgatcatc tacgagggtgt cccagaggcc cagcggcgtg 180  
 agcaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcga gcctgaccat cagcggcctg 240  
 cagaccgagg acgaggccga ctactactgc tgcagctacg ccggcagcag catcttctgt 300

atcttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc cta 333  
 <210> 27  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polinucleotídeo sintético"  
 <400> 27  
 gaggtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctgggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60  
 tcctgcgccc ccagcggctt cacattcagc gcctacaaca ttagatgggt gcggcaggcc 120  
 ccaggcaagg gcctgaaatg ggtgtccgtg atctacccca gcggcggagc caccagatac 180  
 gccgacagcg tgaaggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcccgtt actactgcgc cagggctac 300  
 tactactacg gcatggacgt gtggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354  
 <210> 28  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polinucleotídeo sintético"  
 <400> 28  
 cagagcgtgc tgacccagcc cccaaagcgcc agcggcaccc caggccagag ggtgaccatc 60  
 agctgcagcg gcagcgcacag caacatcgcc aggaactaca tctactggta tcagcagttc 120  
 cccggcaccg cccccaagct gctgatctac aggaacaacc agaggcccag cggcgtgccc 180  
 gacaggatca gcggcagcaa gagcggcacc agcgcaccc tggccatcag cggcctgaga 240  
 agcggaggacg aggccgagta ccactgcggc acctgggacg acagcctgag cggcccagtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330  
 <210> 29  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polinucleotídeo sintético"  
 <400> 29  
 gaagtcaat tgtagagtc tggtggcggt cttgttcagc ctgggtggtc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cacttctct gcttacgta tgggtgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggatg gtttcttat atctctcctt ctgggtggcca tactaagtt 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactcttac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtactg 300  
 gaaactggct tattggttga tgctttgat atctggggcc aaggacaaat ggtcaccgtc 360  
 tcaagc 366  
 <210> 30  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polinucleotídeo sintético"  
 <400> 30  
 cagtagaat tgactcagcc accctcagtg tccgtgtacc caggacagac agccagacatc 60  
 acctgcctcg gagatcaatt ggggagtaaa tttgtttctt ggtatcagca gaggccaggc 120  
 cagtccctcg tgggtgtcat gtataaagat aaaaggcggc cgtcagagat ccctgagcga 180  
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctata 240  
 gatgaggctg actattattt tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggcactggg 300  
 accaagggtca ccgtccata 318  
 <210> 31  
 <211> 357

```

<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:
      Polinucleotídeo sintético"
<400> 31
gaaggtaat tgtagagtc tggggcggt ctgttcagc ctgggggttc tttacgtctt 60
tcttcgcgtg ctccggatt cactttctt cattacgtt tgcttgggt tcgccaagct 120
cctgttaaag gtttggatg ggtttctt atctcttctt ctgggggtg gactctttat 180
gctgactccg ttaaagggtcg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac tagaggtctc 300
aagatggcta caattttga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcaagc 357
<210> 32
<211> 333
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:
      Polinucleotídeo sintético"
<400> 32
cagagcgctt tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag ttagtgggg agttataatg ttgtctctg gtaccaacaa 120
caccaggca aagcccccaa actcatcatt tatgagggtca gtcagcggcc ctcaggggtt 180
tctaattcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacaat ctctgggtc 240
cagactgagg acgagggtcg ttattactgc tgctcatatg caggttagtag tattttcggt 300
atattcggtg gagggaccaa ggtgaccgtc cta 333
<210> 33
<211> 354
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:
      Polinucleotídeo sintético"
<400> 33
gaaggtaat tgtagagtc tggggcggt ctgttcagc ctgggggttc tttacgtctt 60
tcttcgcgtg ctccggatt cactttctt gtttacaata tgcttgggt tcgccaagct 120
cctgttaaag gtttggatg ggtttctt atctatcatt ctgggggtc tactcggtat 180
gctgactccg ttaaagggtcg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtac gagagggtag 300
tactactacg gtatggacgt ctggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc aagc 354
<210> 34
<211> 330
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:
      Polinucleotídeo sintético"
<400> 34
cagagcgctt tgactcagcc accctcagcg tctggggaccc cggggcagag ggtcaccatc 60
tcgtttctg gaagcgactc caacatcgga agaaattata tatattggta ccagcaattc 120
ccaggaacgg ccccaagct cctcatctt aggaataatc agccggccctc aggggtccct 180
gaccgaatct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
tccgaggatg aggctgagta tcactgtgga acatggatg acgcctgag tggtccggta 300
ttcggcggag ggactaaatc gaccgtccta 330
<210> 35
<211> 118
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:
      Polipeptídeo sintético"

```

<400> 35  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
   1               5               10               15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr  
   20               25               30  
 Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
   35               40               45  
 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
   50               55               60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
   65               70               75               80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
   85               90               95  
 Ala Arg Leu Asn Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
   100              105              110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
   115  
 <210> 36  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
       Polipeptídeo sintético"  
 <400> 36  
 Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
   1               5               10               15  
 Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp  
   20               25               30  
 Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu  
   35               40               45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser  
   50               55               60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln  
   65               70               75               80  
 Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro  
   85               90               95  
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
   100              105  
 <210> 37  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
       Polipeptídeo sintético"  
 <400> 37  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
   1               5               10               15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
   20               25               30  
 Gly Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
   35               40               45  
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val 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 Gly Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly  
   100              105              110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 38  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 38  
 Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp  
 20                   25                   30  
 Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35                   40                   45  
 Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50                   55                   60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser  
 85                   90                   95  
 Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100                   105                   110  
 <210> 39  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 39  
 Trp Tyr Gly Met Gly  
 1                   5  
 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 40  
 Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Gly  
 <210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 41  
 Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val  
 1                   5  
 <210> 42  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>

<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 42  
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp Ser Leu Asn  
1 5 10  
<210> 43  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 43  
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
1 5  
<210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 44  
Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro Phe Thr  
1 5  
<210> 45  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 45  
Arg Tyr Gly Met Trp  
1 5  
<210> 46  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 46  
Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly  
  
<210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
Peptídeo sintético"  
<400> 47  
Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser  
1 5 10  
<210> 48  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 48  
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp Asn Ile Val Ser  
     1                  5                         10  
 <210> 49  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 49  
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser  
     1                  5  
 <210> 50  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Peptídeo sintético"  
 <400> 50  
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val  
     1                  5                         10  
 <210> 51  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 51  
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
     1                  5                 10                         15  
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr  
     20                 25                                 30  
 Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
     35                 40                         45  
 Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
     50                 55                         60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
     65                 70                         75                 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser  
     85                 90                         95  
 Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
     100                 105                         110  
 <210> 52  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> /nota: "Descrição da Sequência Artificial:  
     Polipeptídeo sintético"  
 <400> 52  
 Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
     1                  5                 10                         15  
 Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp  
     20                 25                         30  
 Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu

35	40	45													
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser
50					55						60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	Leu	Gln
65					70					75				80	
Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	Asn	Ala	Pro
					85					90				95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Arg				
					100					105					
<210>	53														
<211>	110														
<212>	PRT														
<213>	Sequência Artificial														
<220>															
<223>	/nota: "Descrição da Sequência Artificial:														
	Polipeptídeo sintético"														
<400>	53														
Gln	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1					5					10				15	
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Ile	Gly	Arg	Trp
												20		25	30
Asn	Ile	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
												35		40	45
Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
												50		55	60
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
												65		70	75
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
												85		90	95
Ser	Thr	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
												100		105	110

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção do mesmo que se liga a antígeno, que se liga a ErbB3, caracterizado(a) pelo fato de que compreende:

- 5 a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:7;
- b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:8;
- c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada 10 compreendendo a SEQ ID NO:9;
- d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:10;
- e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:11; e
- 15 f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:12.

2. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção do mesmo que se liga a antígeno, que se liga a ErbB3, caracterizado(a) pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID 20 NO:1 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:2.

3. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção do mesmo que se liga a antígeno, que se liga a ErbB3, caracterizado(a) pelo fato de que compreende uma cadeia pesada de região variável compreendendo a SEQ ID 25 NO:1 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 80% homóloga a mesma e uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 80% homóloga a mesma.

4. Anticorpo monoclonal isolado ou porção do mesmo que se liga a antígeno, caracterizado(a) pelo fato de que se liga ao epitopo que é o mesmo ou se sobrepõe ao epitopo ligado pelo anticorpo como definido na

reivindicação 2.

5. Anticorpo monoclonal isolado ou porção do mesmo que se liga a antígeno, caracterizado(a) pelo fato de que compete pela ligação a ErB3 com o anticorpo como definido na reivindicação 2.

5 6. Anticorpo ou porção do mesmo que se liga a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo biespecífico e um anticorpo quimérico.

10 7. Anticorpo ou porção do mesmo que se liga a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado(a) pelo fato de que é selecionado(a) do grupo consistindo de um Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, affibody, avimer, nanobody e um anticorpo de domínio.

15 8. Anticorpo ou porção do mesmo que se liga a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado(a) pelo fato de que o isótipo do anticorpo é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE.

20 9. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção do mesmo que se liga a antígeno, como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 em um carreador farmaceuticamente aceitável.

25 10. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica uma região variável do anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) na reivindicação 3, em que o anticorpo ou porção do mesmo que se liga a antígeno codificado(a) compreende uma sequência pelo menos 90% idêntica à região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 25, a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 26, ou uma combinação das mesmas.

11. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que

codifica uma região variável do anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) na reivindicação 3, compreendendo uma sequência que hibridiza sob alta estringência à sequência de nucleotídeos da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 25, à região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 26.

5 12. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido nas reivindicações 10 ou 11.

13. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido nucléico como definido na reivindicação 12.

10 14. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que produz um anticorpo ou uma porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15 15. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que produz um anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) na reivindicação 1 ou 3, em que o anticorpo é codificado por uma sequência de nucleotídeos de região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 25 e uma sequência de nucleotídeos de região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 26, e suas modificações de sequências conservativas.

20 16. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais anticorpos monoclonais isolados ou suas porções de ligação a antígeno como definidos(as) em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, e instruções para uso no tratamento ou diagnóstico de uma doença associada com a sinalização dependente de ErbB3.

25 17. Kit de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a doença é um câncer.

18. Uso de um anticorpo monoclonal isolado ou porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um

medicamento para inibir a sinalização de ErbB3 em um paciente.

19. Uso de um anticorpo monoclonal isolado ou porção do mesmo que se liga ao antígeno como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para tratar câncer em um paciente.

5 20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo de melanoma, câncer de mama, câncer ovariano, carcinoma renal, câncer gastrintestinal/de cólon, câncer pulmonar, sarcoma de células transparentes e câncer prostático.

10 21. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizado pelo fato de que o paciente é um ser humano.

15 22. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno é administrado ao paciente de forma intravenosa, intramuscular ou subcutânea.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno é administrado em combinação com um segundo agente terapêutico.

20 24. Uso de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um segundo anticorpo ou porção do mesmo que se liga ao antígeno.

25 25. Uso de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um agente anticâncer.

26. Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o agente anticâncer é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo, uma molécula pequena, um antimetabólito, um agente de alquilação, um inibidor da topoisomerase, um agente de alvejamento de microtúbulo, um inibidor da quinase, um inibidor da síntese protéica, um imunoterapêutico, um hormônio ou seu análogo, um análogo da somatostatina, um glicocorticóide, um

inibidor da aromatose, uma molécula pequena de alvejamento de EGFR e um inibidor de mTOR.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-IGF1R, um anticorpo anti-EGFR, 5 ou um anticorpo anti-cmet.

28. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena se liga a IGF1R, EGFR ou cmet.

29. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena de alvejamento de EGFR é gefitinib, lapatinib 10 ou elotinib.

30. Método para diagnosticar um câncer associado com ErbB3 em um paciente, caracterizado pelo fato de que compreende (a) colocar em contato as células *ex vivo* ou *in vivo* do paciente com um anticorpo monoclonal isolado ou porção que se liga ao antígeno do mesmo como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e (b) medir o nível de 15 ligação ao ErbB3 sobre as células, em que níveis anormalmente elevados de ligação ao ErbB3 indicam que o paciente tem um câncer associado com ErbB3.

31. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que:  
20 é um anticorpo monoclonal IgG de comprimento total isolado, se liga a ErbB3 com um  $K_D$  de cerca de 4 nM como medido usando um ensaio de ressonância de plásmon superficial ou um ensaio de ligação celular usando células MALME-3M e  
compreende uma CDR1 de região variável de cadeia pesada  
25 compondo a SEQ ID NO:7; uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:8; uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:9; uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:10; uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:11 e uma CDR3 de

região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:12.

32. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que:

é um anticorpo monoclonal IgG de comprimento total isolado, se liga a ErbB3,

5 infrarregula o receptor de ErbB3 em células MALME-3M de modo que, em uma concentração de anticorpo de 100 nM, níveis de ErbB3 nas superfícies das células são diminuídos em pelo menos 50% e

compreende uma CDR1 de região variável de cadeia pesada  
compreendendo a SEQ ID NO:7; uma CDR2 de região variável de cadeia  
pesada comprendendo a SEQ ID NO:8; uma CDR3 de região variável de  
cadeia pesada comprendendo a SEQ ID NO:9; uma CDR1 de região variável  
de cadeia leve comprendendo a SEQ ID NO:10; uma CDR2 de região  
variável de cadeia leve comprendendo a SEQ ID NO:11 e uma CDR3 de  
região variável de cadeia leve comprendendo a SEQ ID NO:12.

15 33. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que:

é um anticorpo monoclonal IgG de comprimento total isolado, se liga a ErbB3,

exibe um IC<sub>50</sub> para fosforilação de ErbB3 mediada por betacelulina que é de 5,32<sup>-10</sup> M a 1,32<sup>-9</sup> M em células ADRr estimuladas com 20 betacelulina e

compreende uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:7; uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:8; uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:9; uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:10; uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:11 e uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:12.

34. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que:

é um anticorpo monoclonal IgG de comprimento total isolado, se liga a ErbB3,

em uma concentração de 63 nM, causa uma diminuição na fosforilação de AKT mediada por heregulina de cerca de 100% em células

5 MALME-3M e

compreende uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:7; uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:8; uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:9; uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:10; uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:11 e uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:12.

10

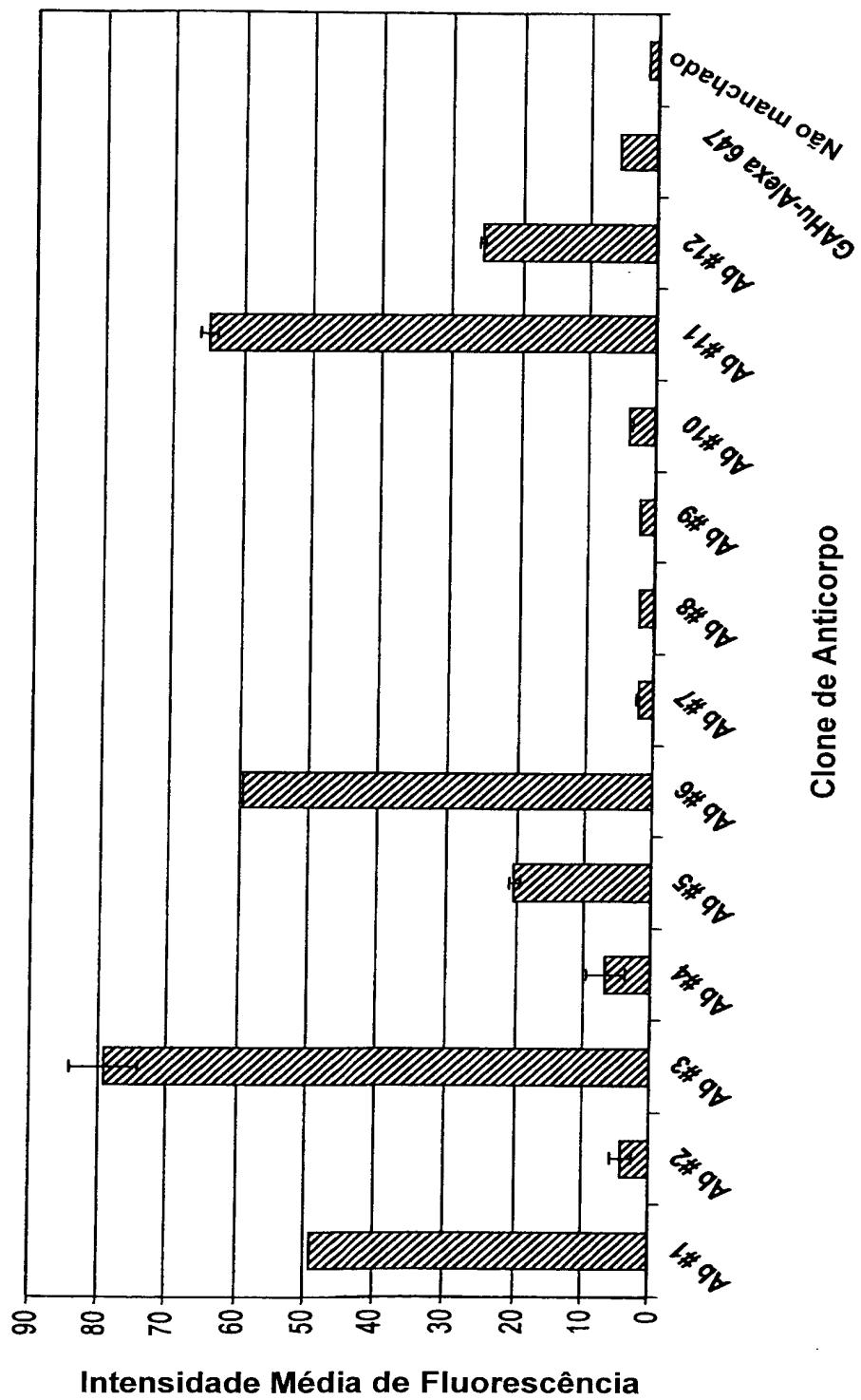
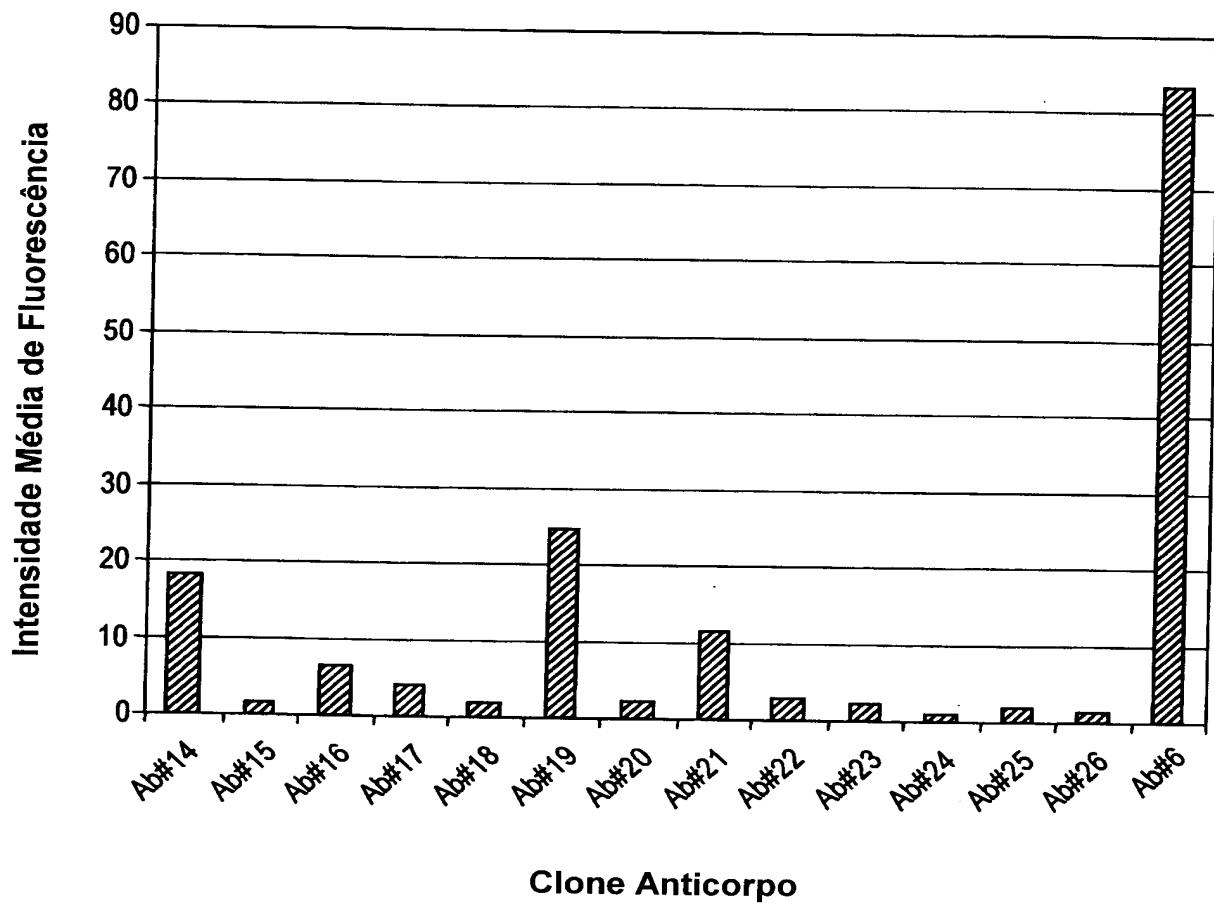


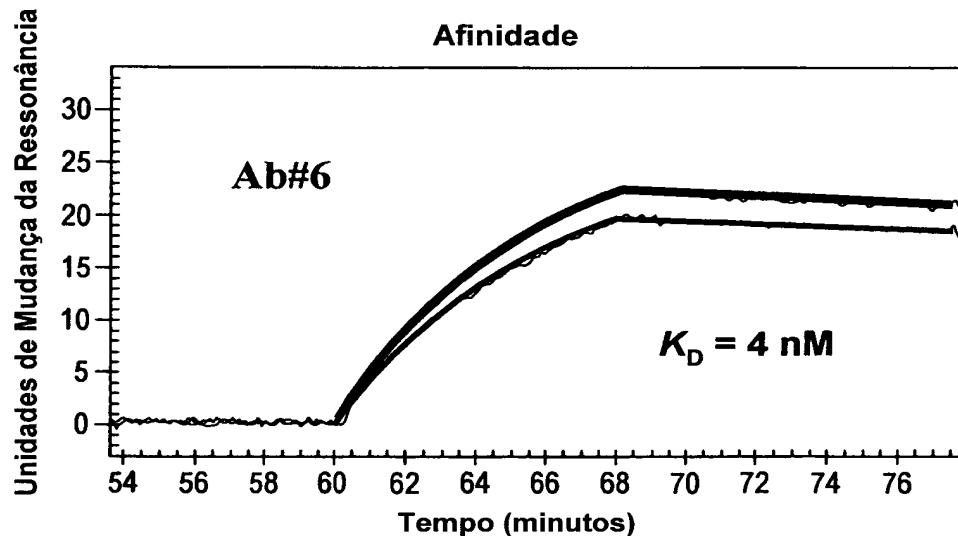
Fig. 1A



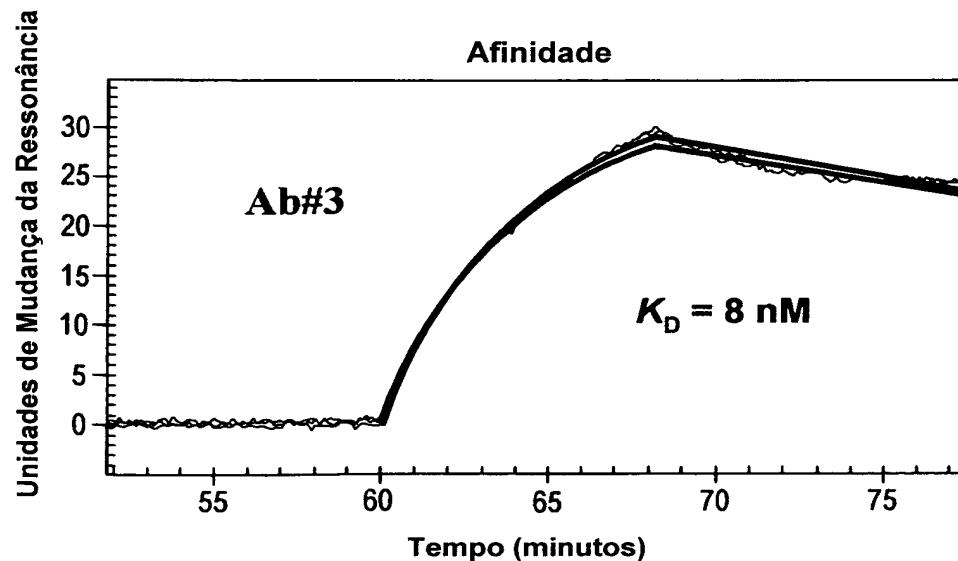
*Fig. 1B*

## Ligação de Anticorpos ao ErbB3 Medida por SPR

$$K_D = k_d/k_a$$



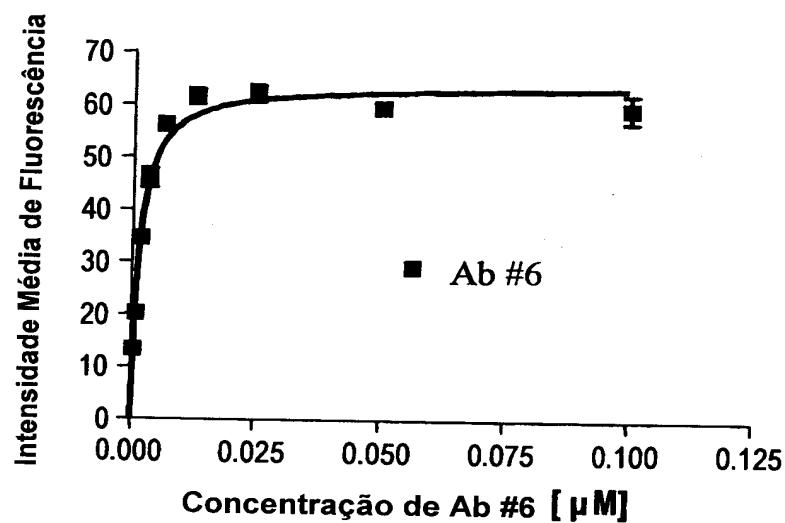
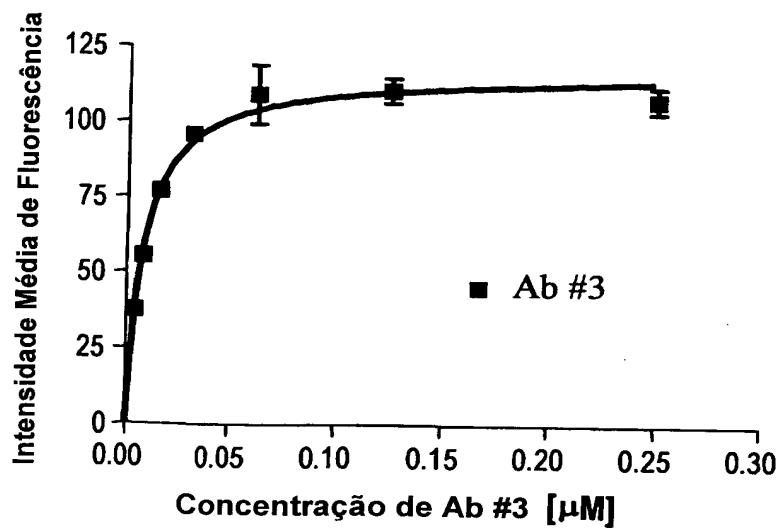
*Fig. 2A*



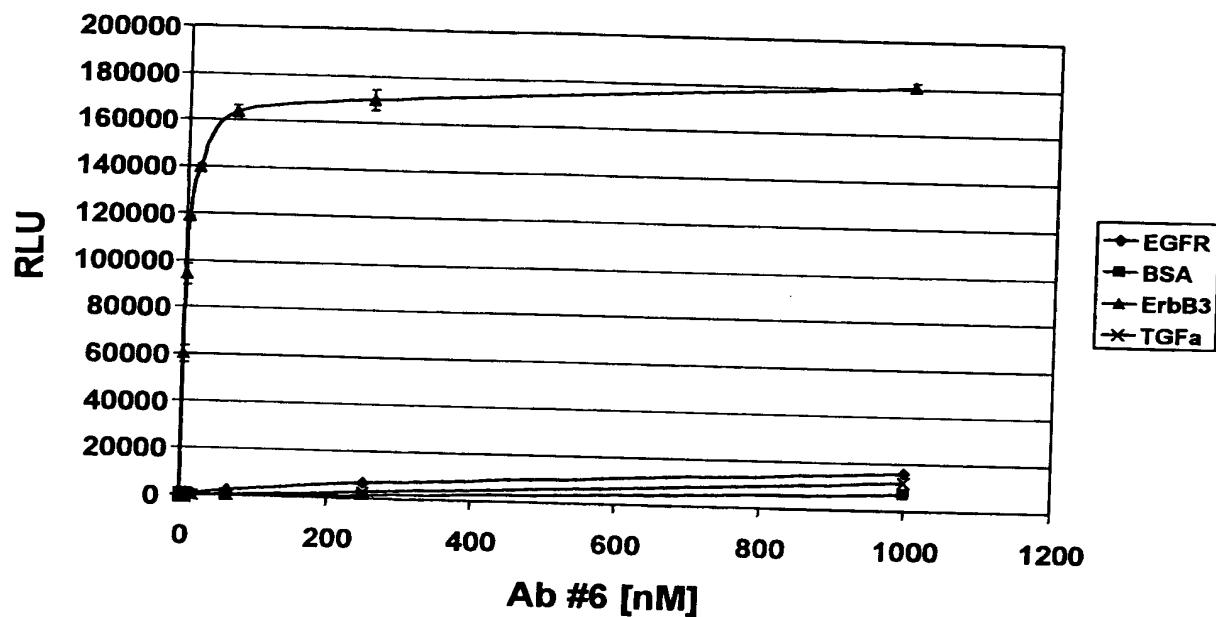
*Fig. 2B*

**Ensaio de Ligação Celular para anticorpos às células MALME-3M**

$$Y = B_{max} \cdot X / K_D + X$$

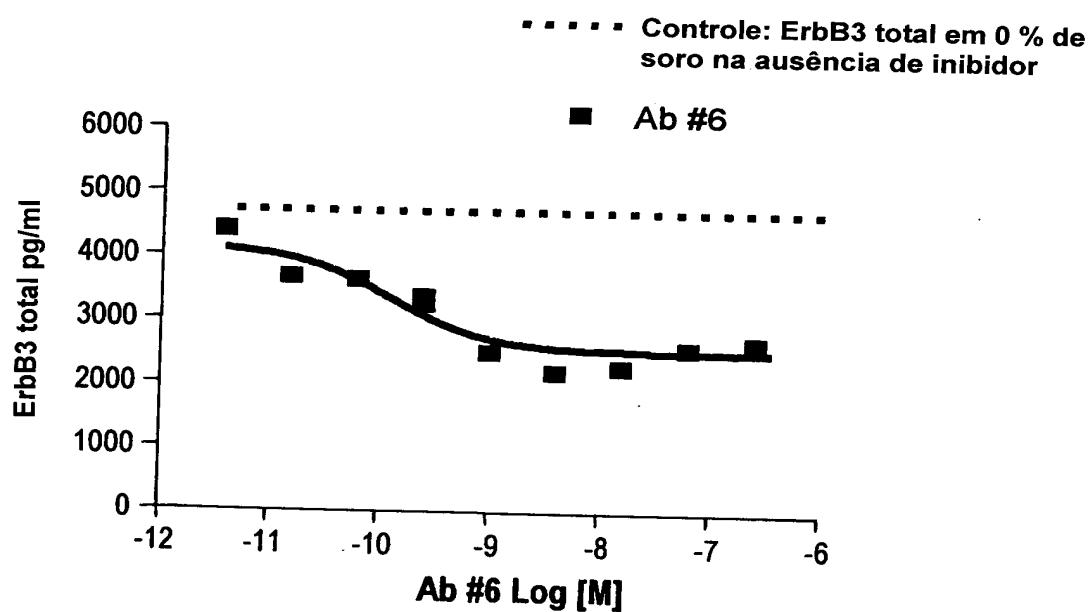
*Fig. 2C**Fig. 2D*

**A ligação de IgG2 a Ab #6 é específica para ErbB3**



*Fig. 3*

**O anticorpo #6 causa um decréscimo nos níveis totais de ErbB3 nas células de melanoma MALME 3M in vitro medidos por ELISA**



*Fig. 4*

Regulação negativa dos  
receptores de ErbB3  
em células MALME-3M  
(melanoma) com IgG1 e  
IgG2 de Ab #6 medida por FACS

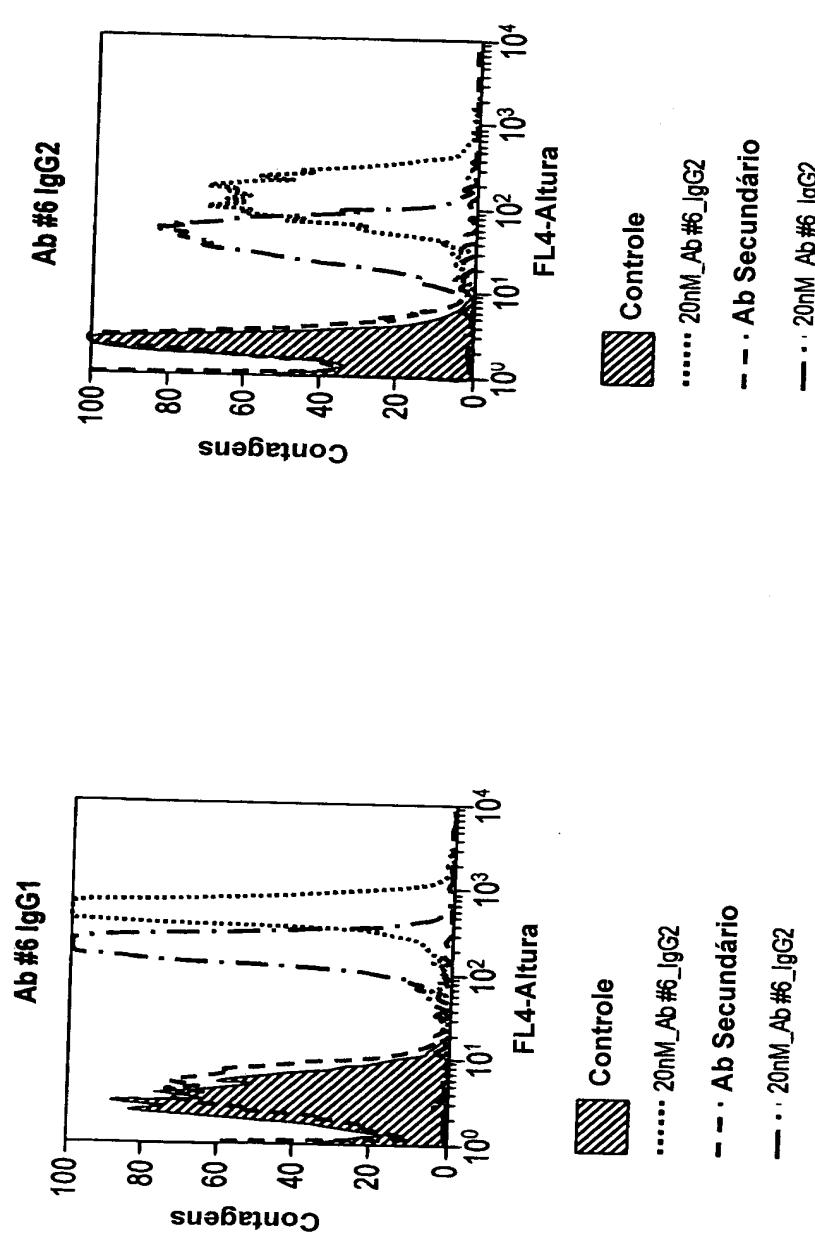


Fig. 5A

Regulação negativa dos  
receptores de ErbB3  
em células MALME-3M  
(melanoma) com IgG1 e  
IgG2 de Ab #6 medida por FACS

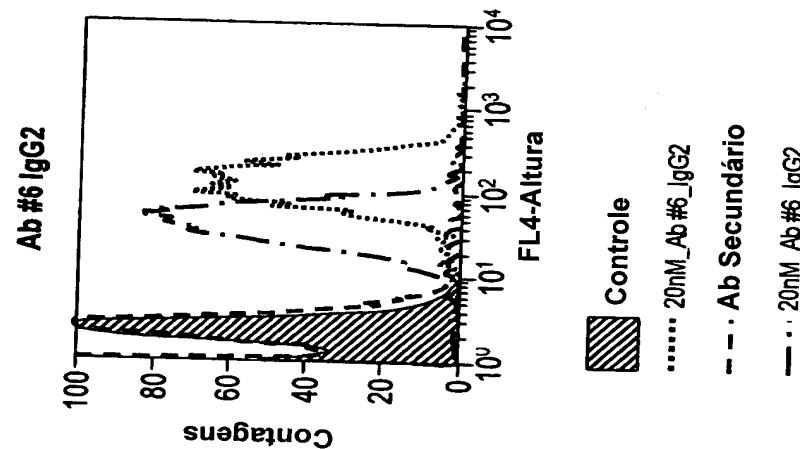


Fig. 5B

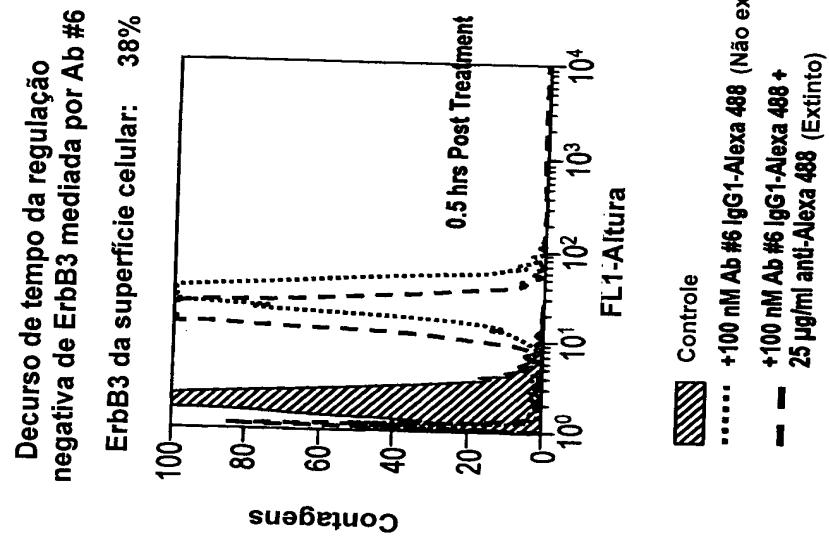
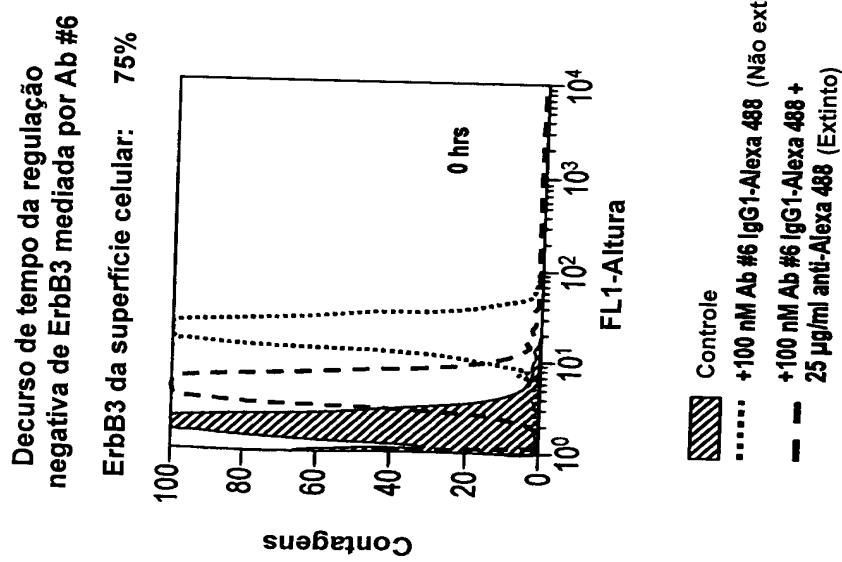


Fig. 6A

Fig. 6B

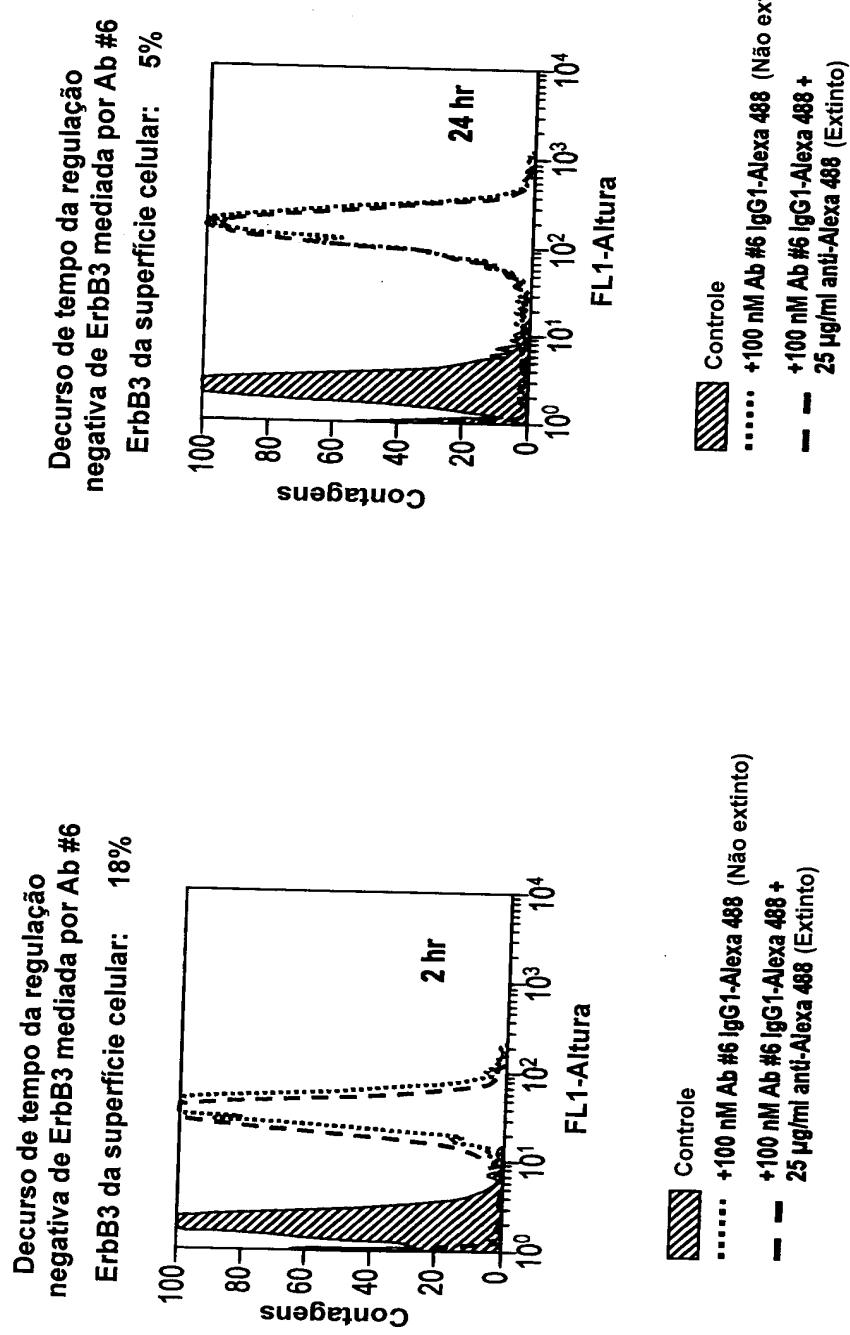
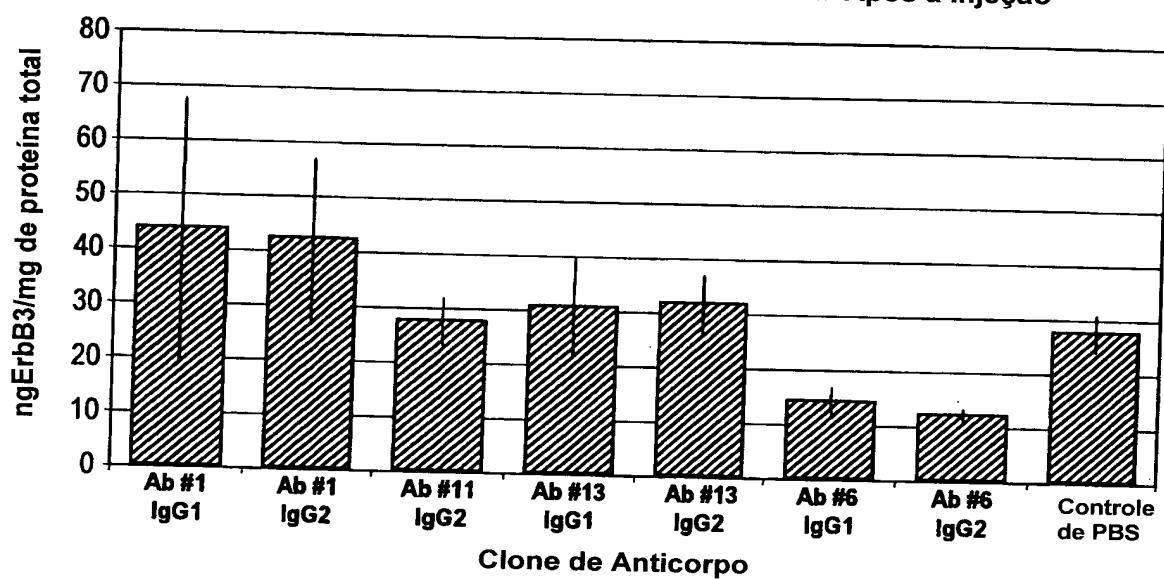


Fig. 6C

Fig. 6D

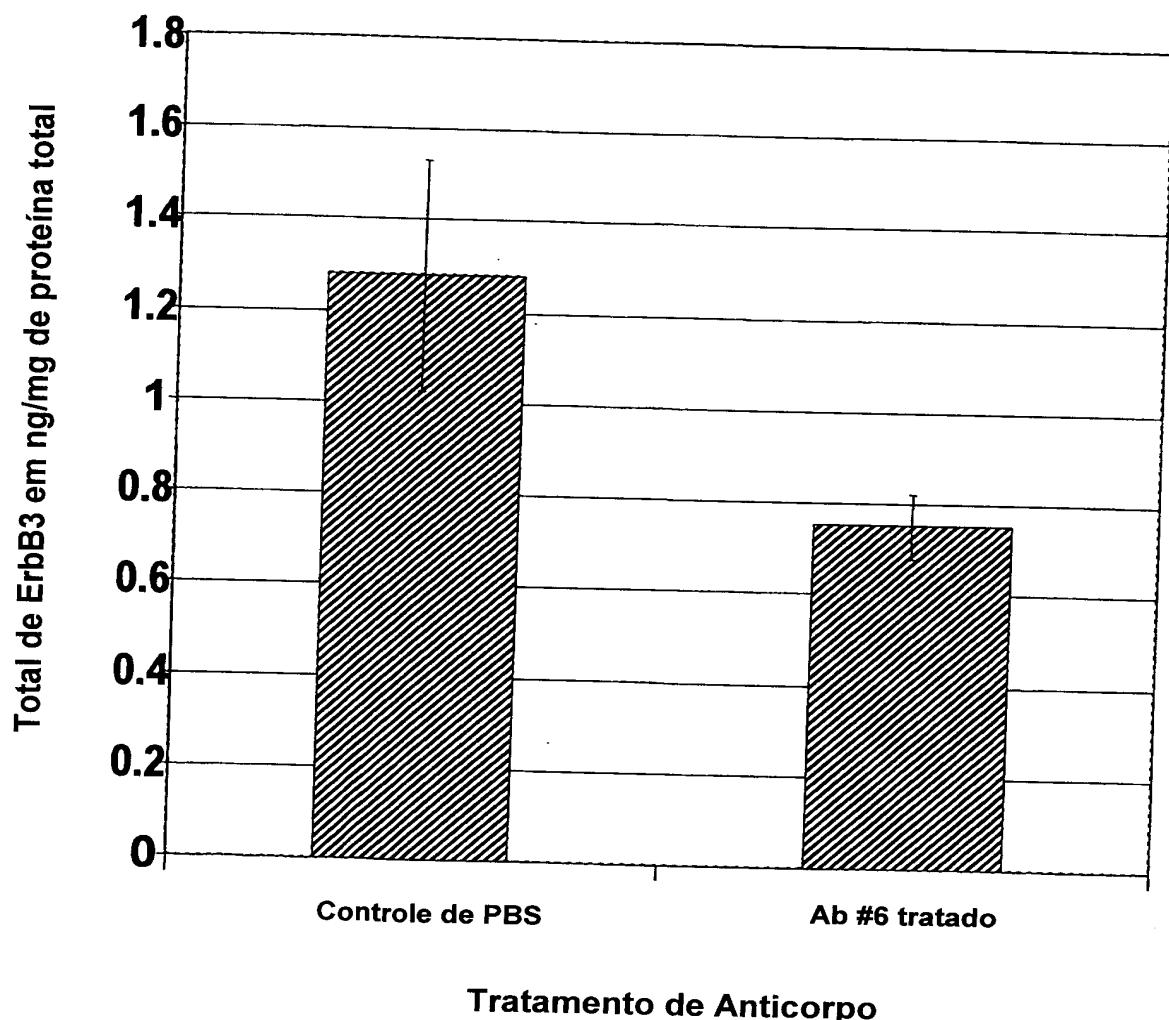
**Ab #6 causa regulação negativa do ErbB3 nas células de melanoma in vivo**

**Níveis totais de ErbB3 no Estudo MALME3M PD Após a injeção**



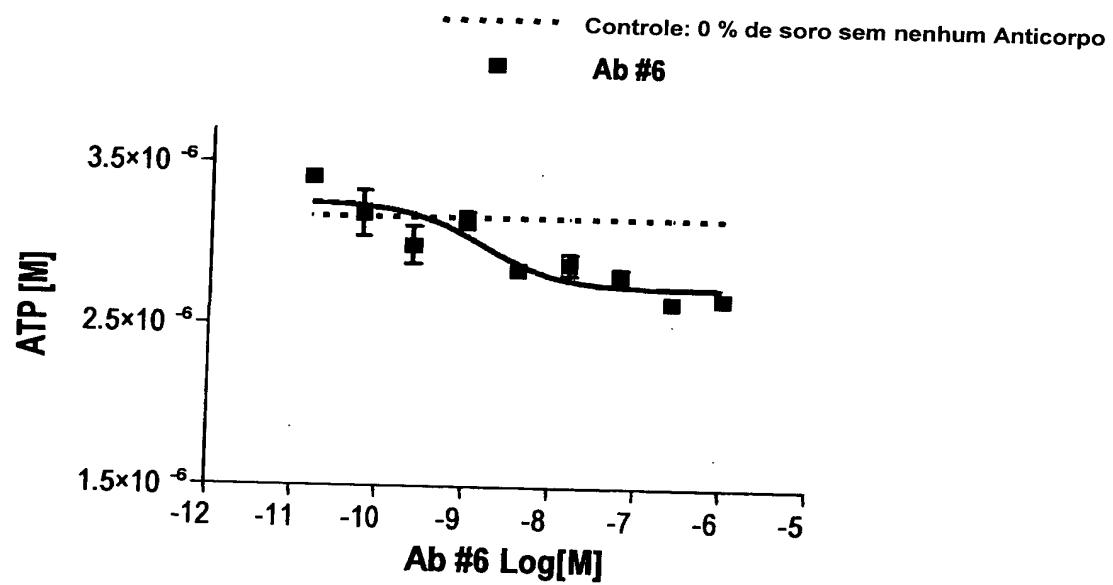
*Fig. 7*

**Níveis totais de ErbB3 em xenoenxertos ADRr**



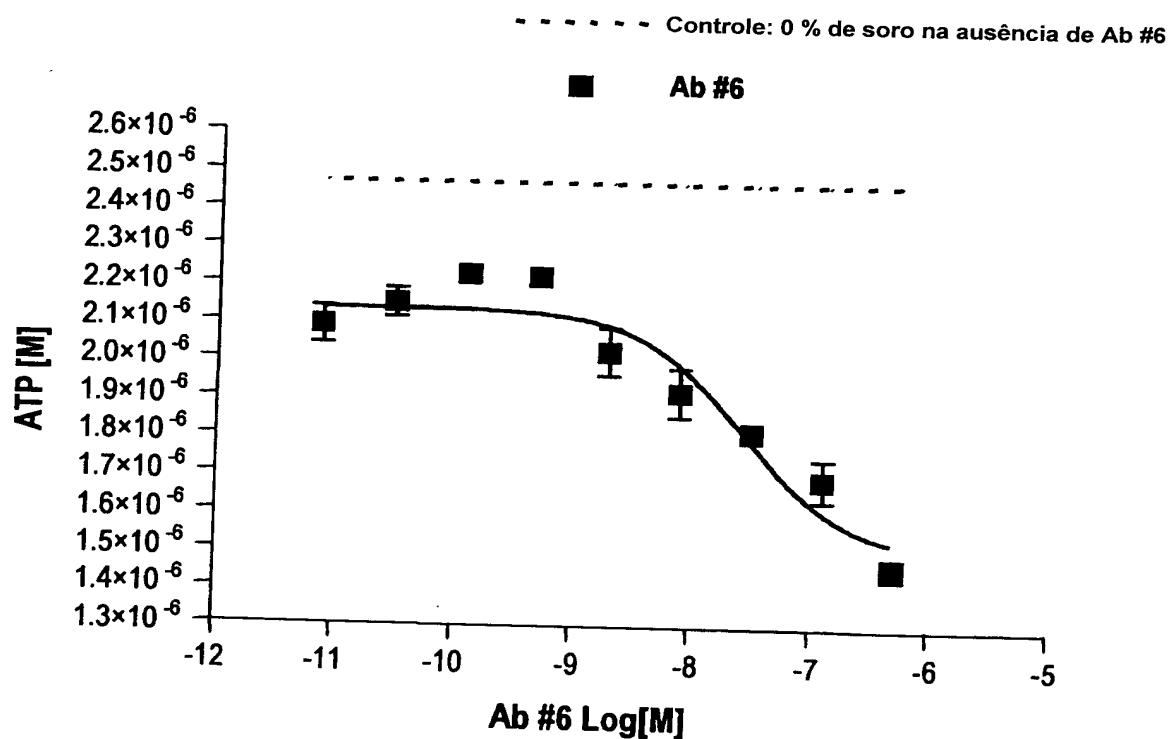
*Fig. 8*

**Ab #6 inibe a proliferação nas células de melanoma  
MALME 3M medidas pelo ensaio Cell Titer Glow**

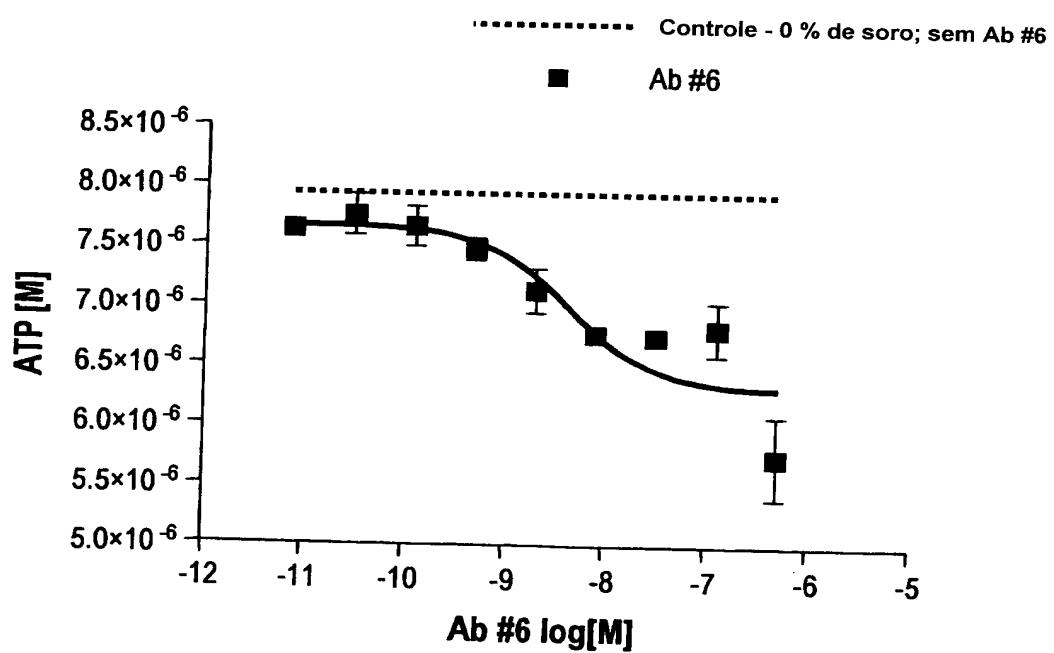


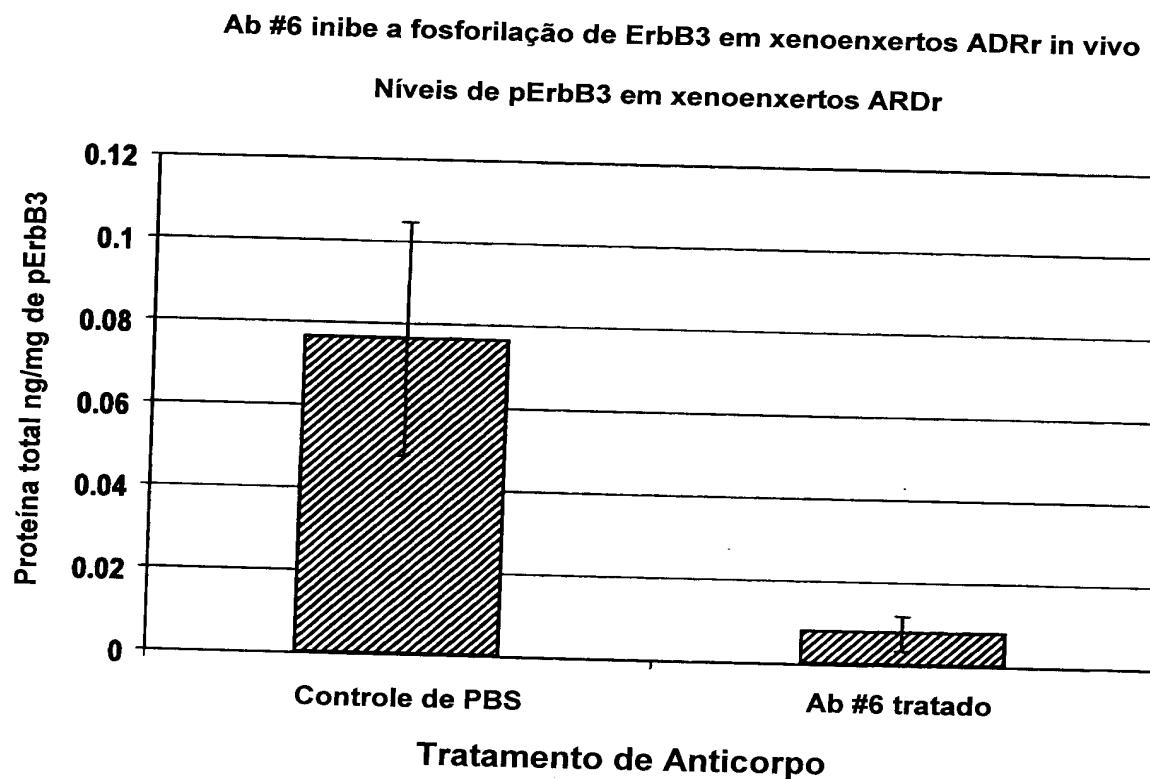
*Fig. 9*

**Ab #6 inibe a proliferação celular nas linhagens celulares ADRr (ovarianas)**



*Fig. 10*

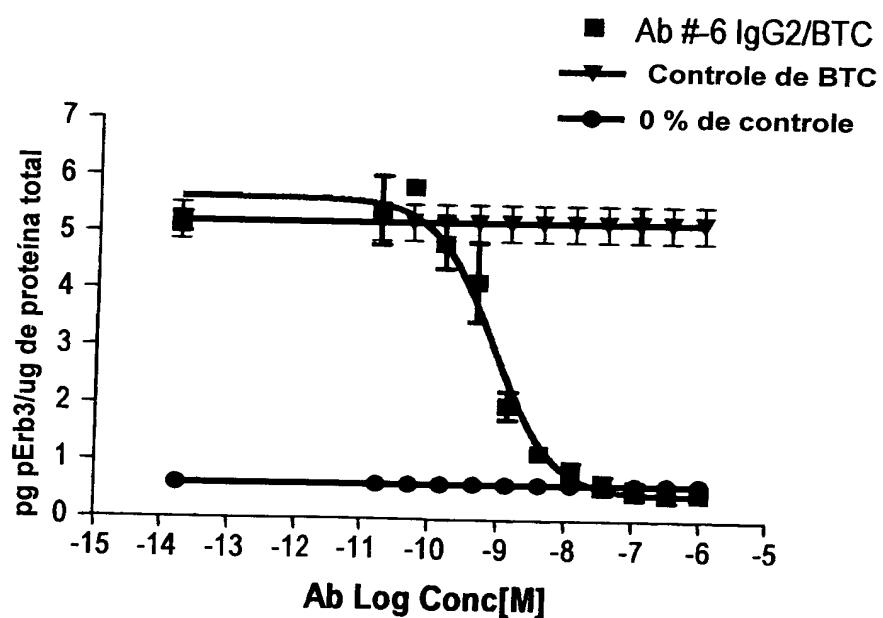
**Ab #6 inibe a proliferação celular na linhagem celular ACHN***Fig. 11*

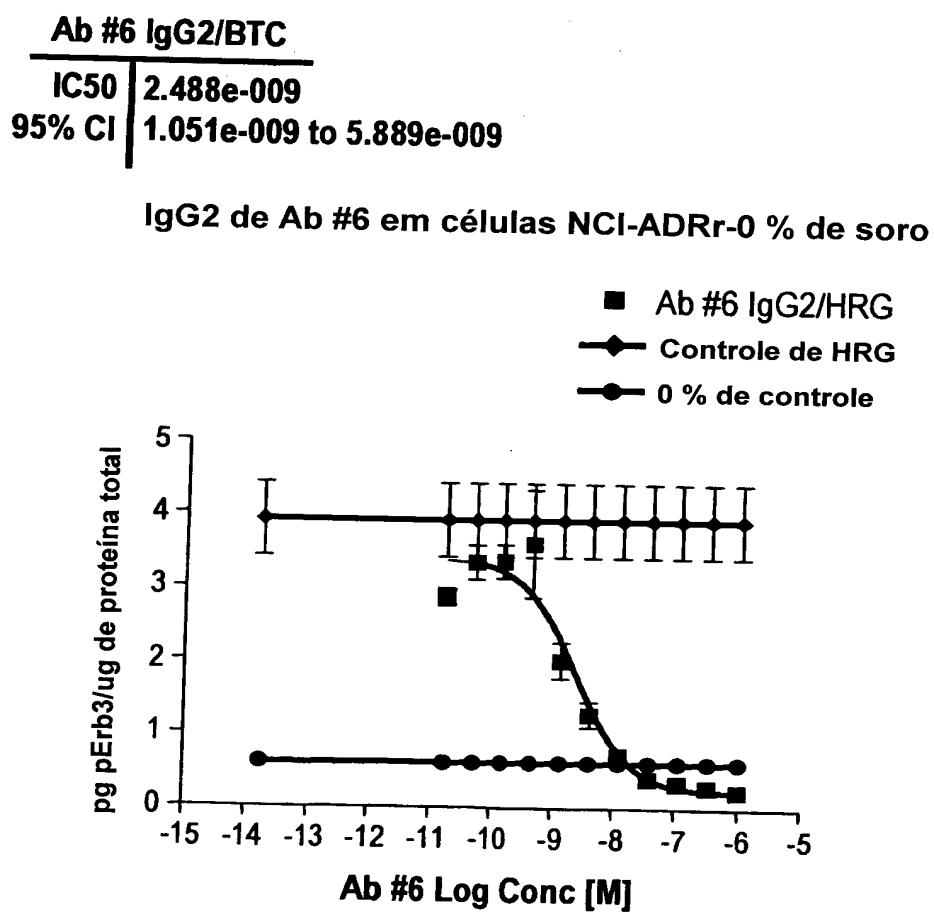


*Fig. 12*

**Ab #6 IgG2/BTC**

IC50	8.37e-10 M
95% CI	5.32e-10 to 1.32e-9

**IC50 de Ab #6 em células NCI-ADRr-0 % de soro***Fig. 13A*



*Fig. 13B*

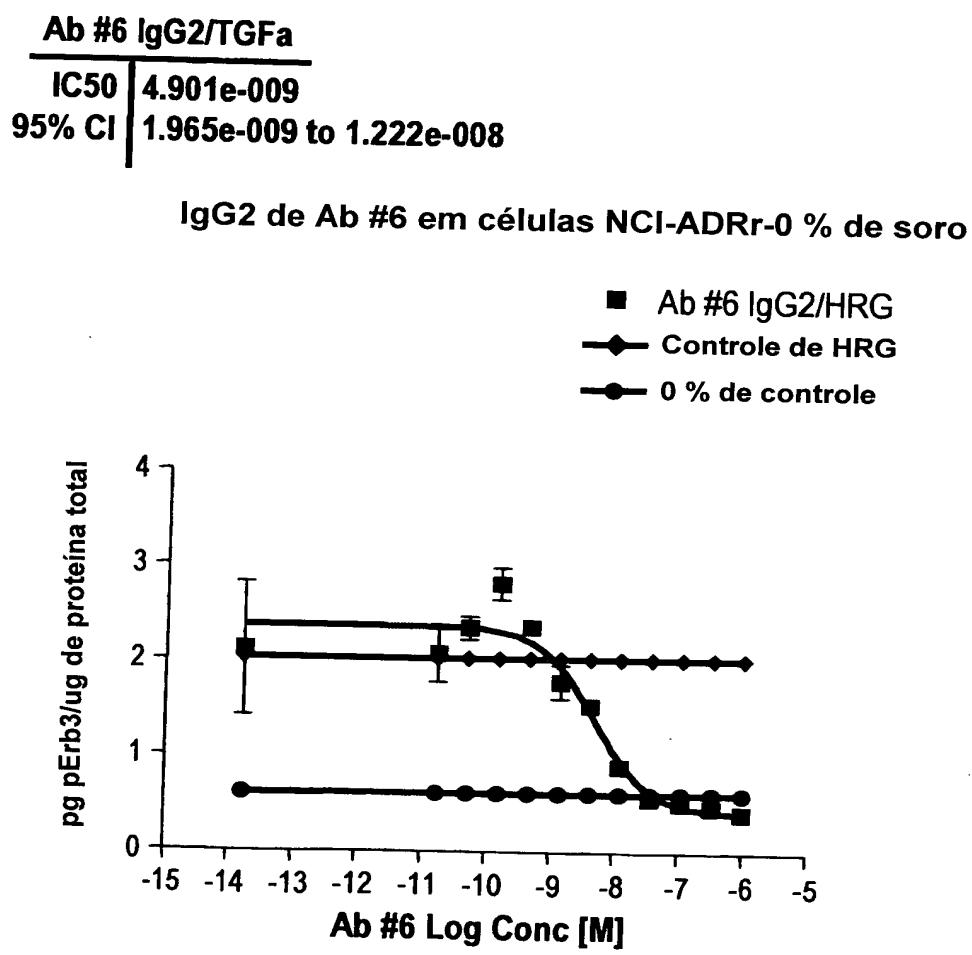
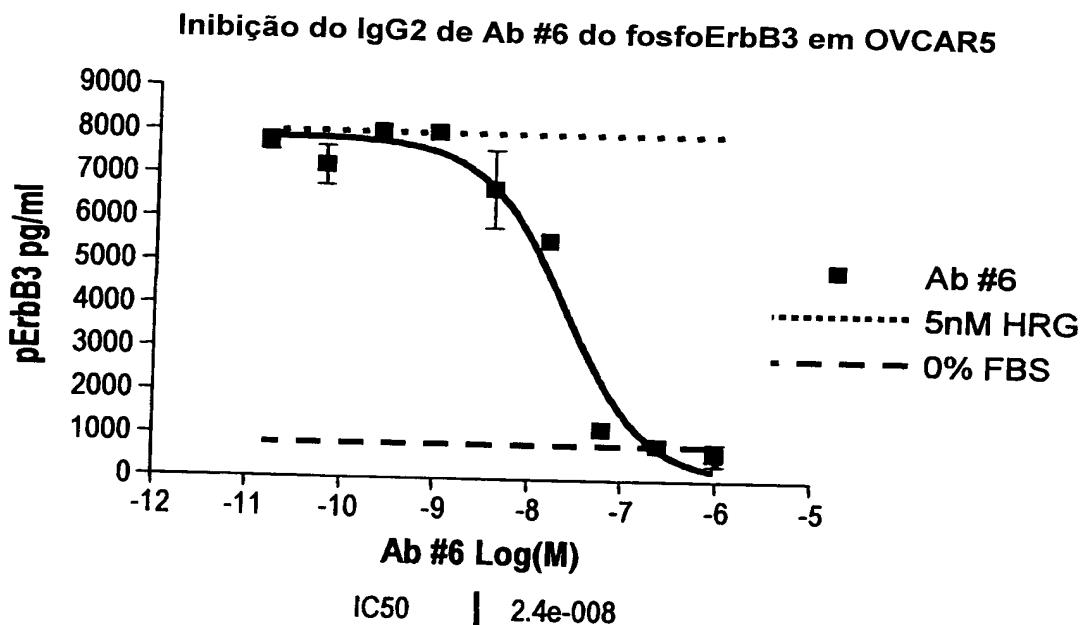
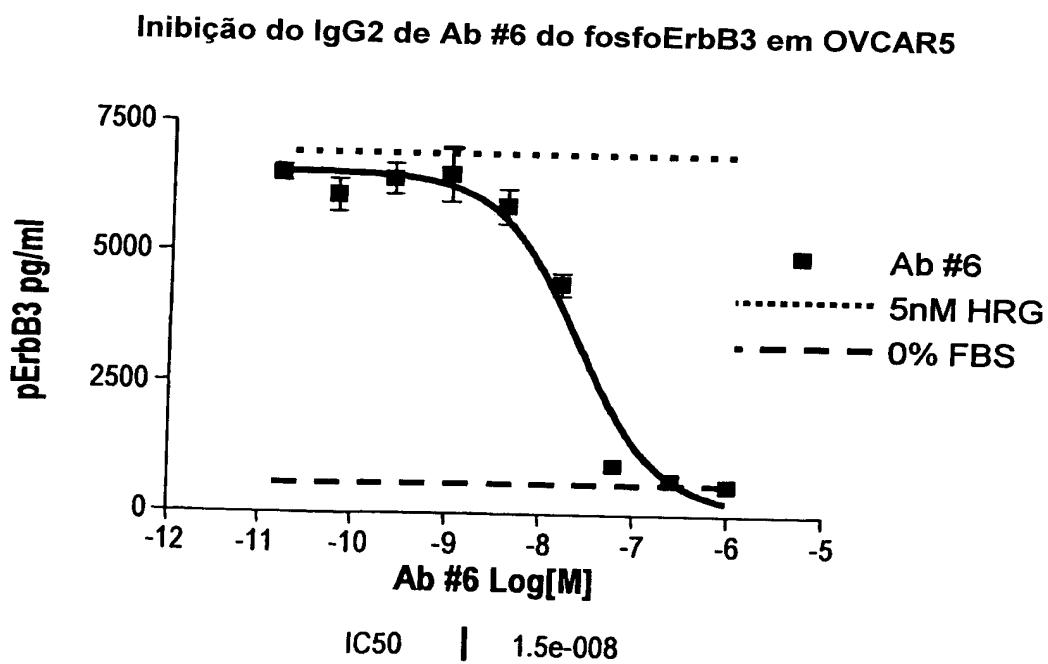


Fig. 13C

*Fig. 14A**Fig. 14B*

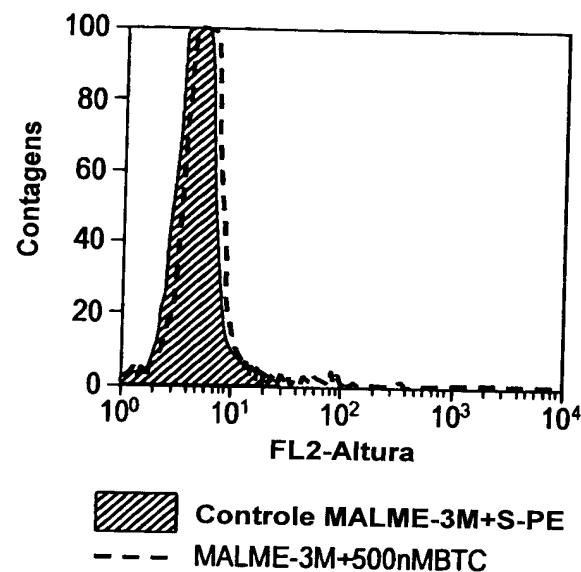


Fig. 15A

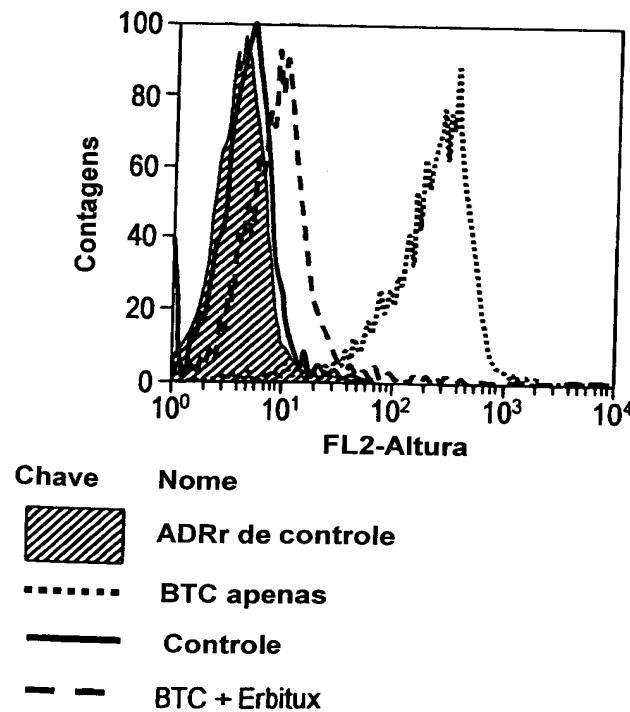
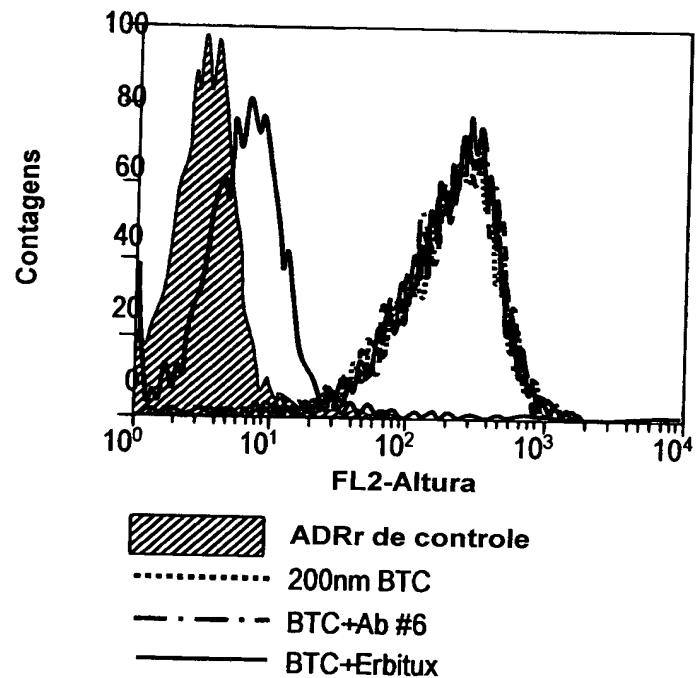


Fig. 15B

**Bloqueio da Ligação de BTC por Erbitux, mas não Ab #6**



*Fig. 15C*

IgG2 de Ab #6 inibe a sinalização mediada pela heregulina com IC50s similares em MALME 3M

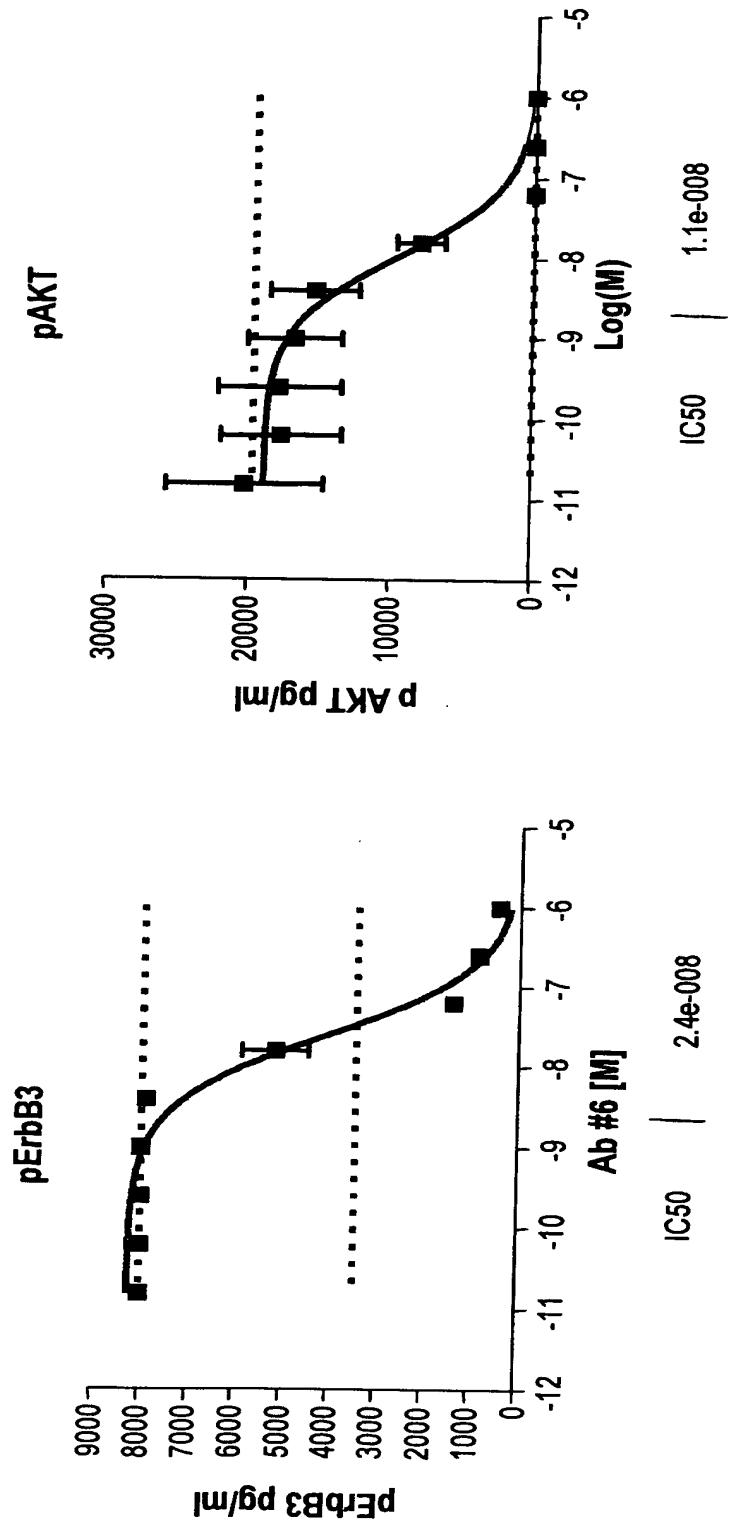
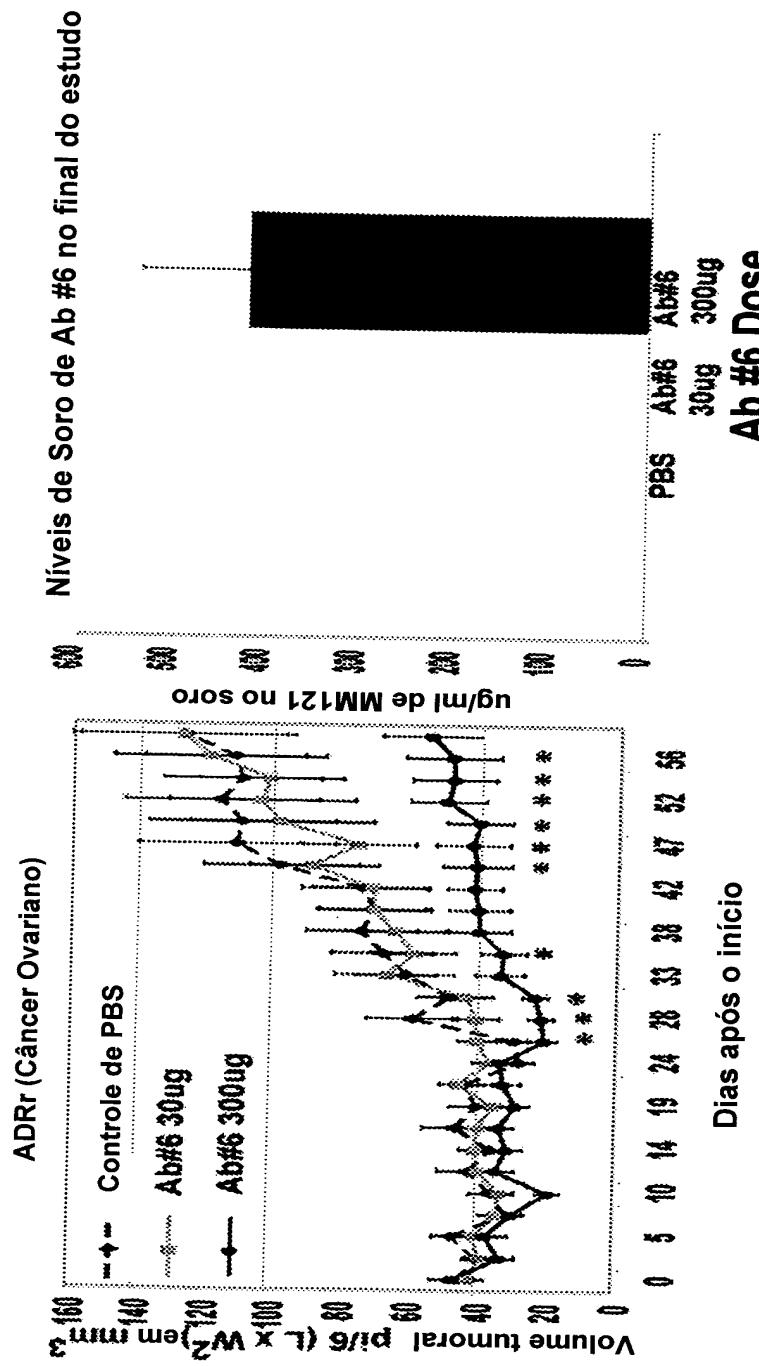


Fig. 16A

Fig. 16B

## Inibição de Ab #6 do Crescimento Tumoral

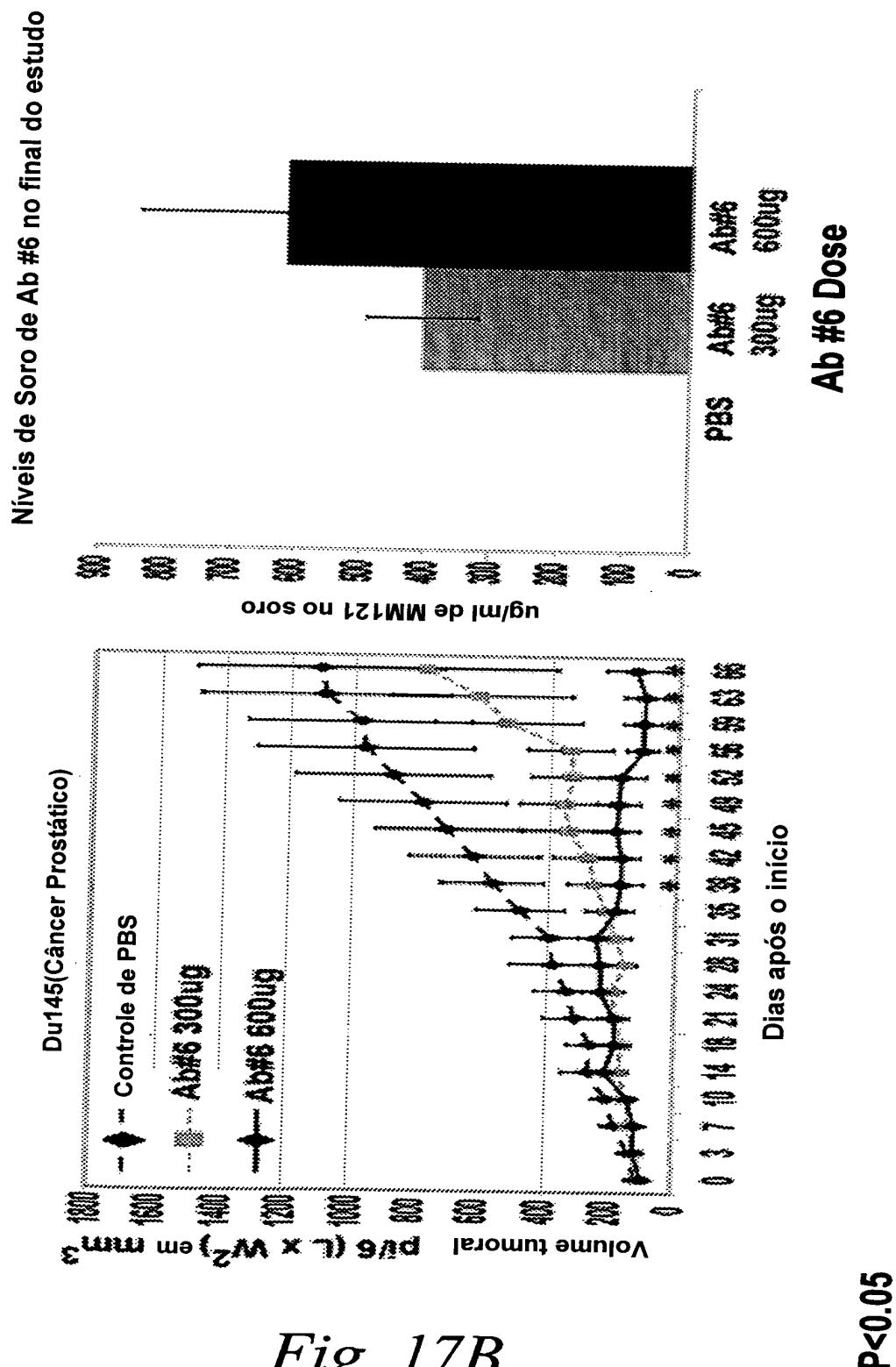


\*P<0.05

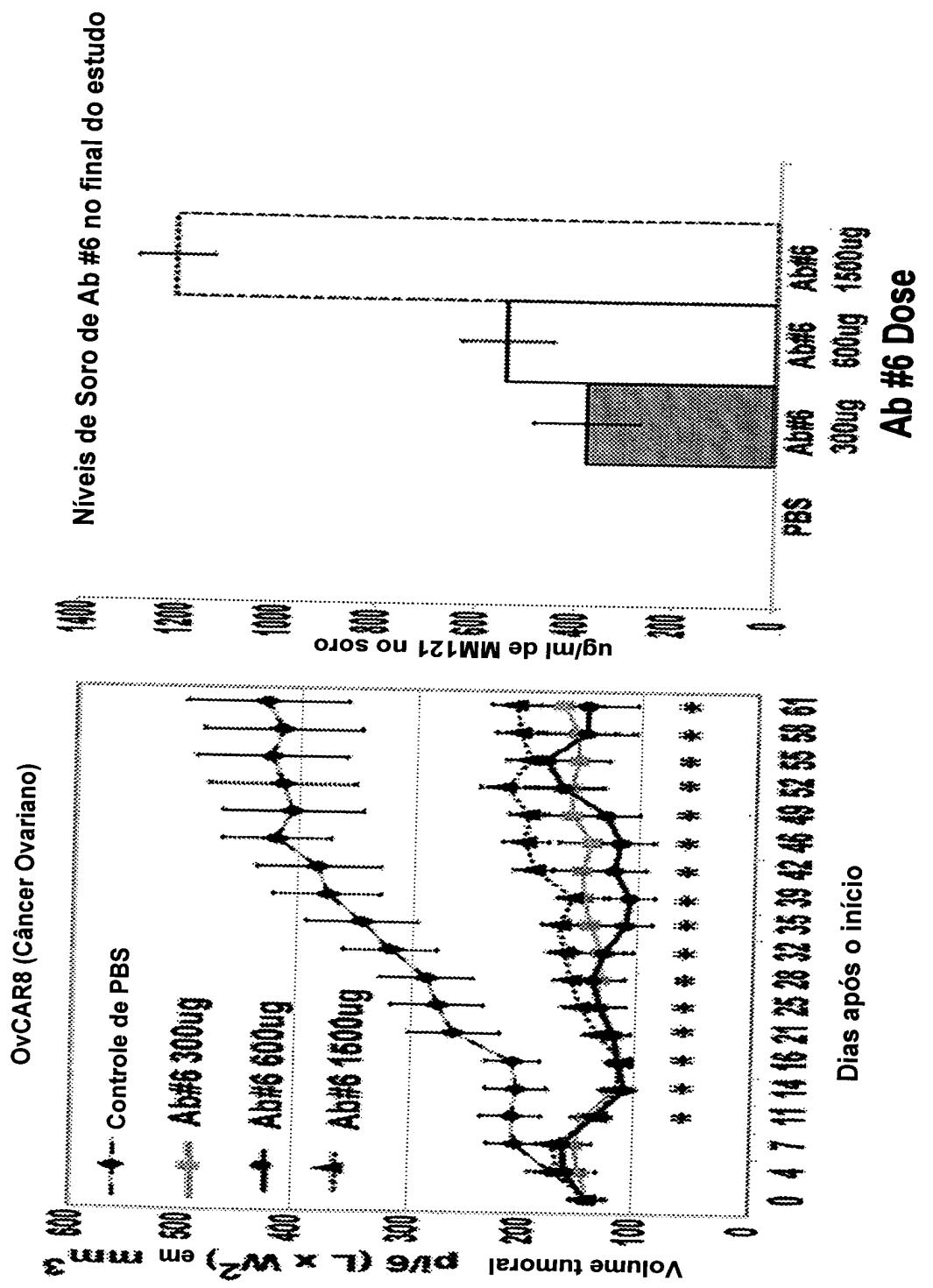
Fig. 17A

## Inibição de Ab #6 do Crescimento Tumoral

24/43



### Inibição de Ab #6 do Crescimento Tumoral



*Fig. 17C*

### Ab #6 Inhibition of Tumor Growth

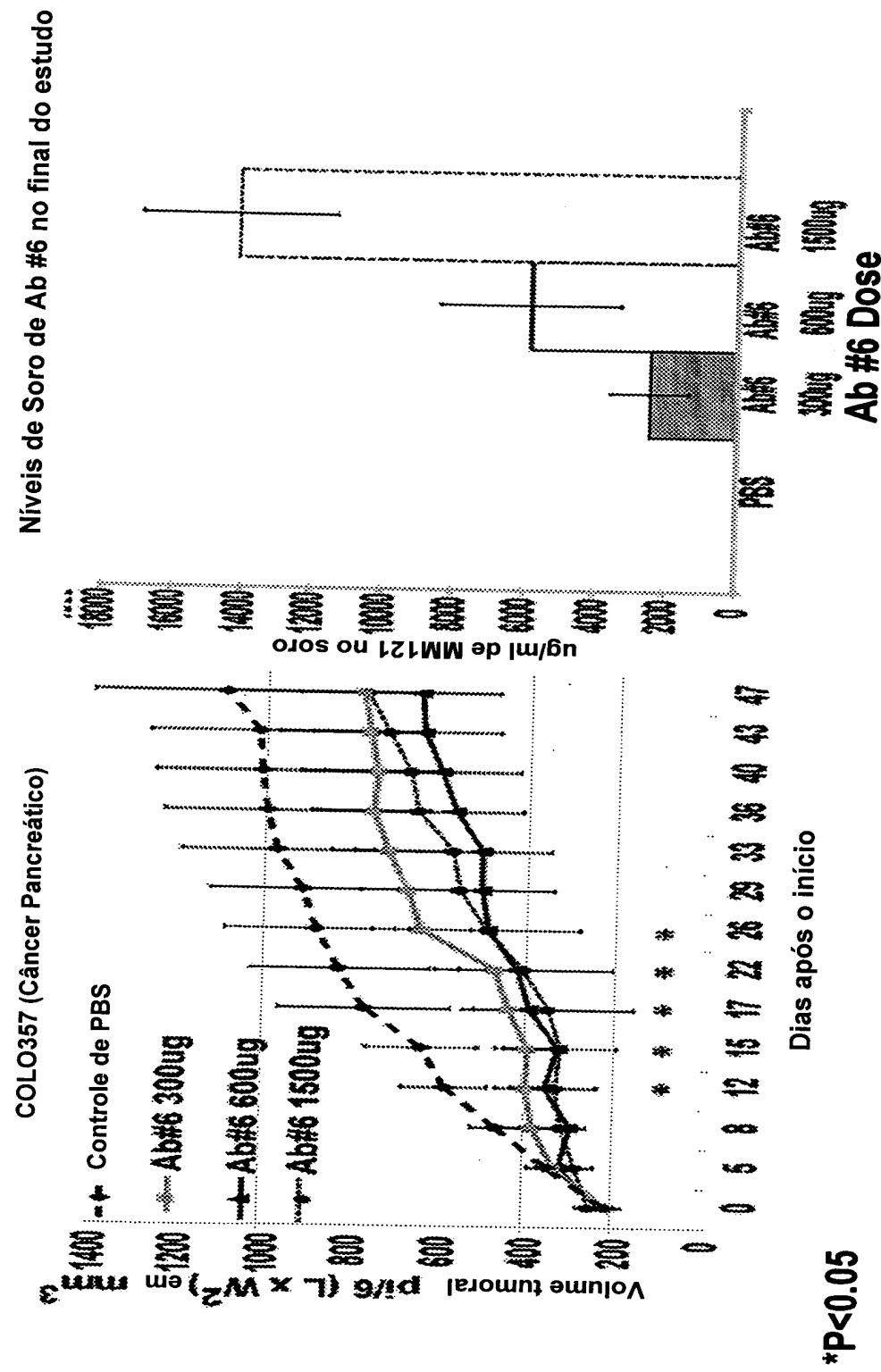


Fig. 17D

Bloqueio da Ligação de HRG a MALME3 por Ab #6

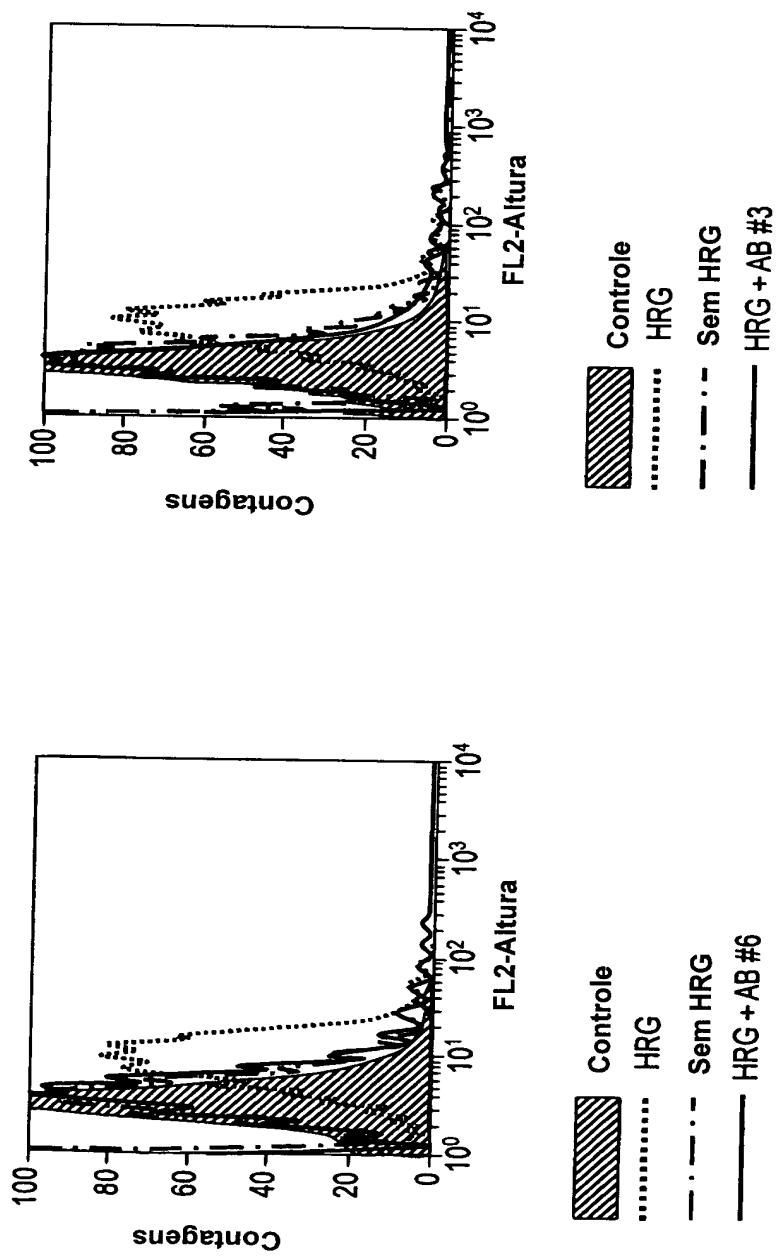
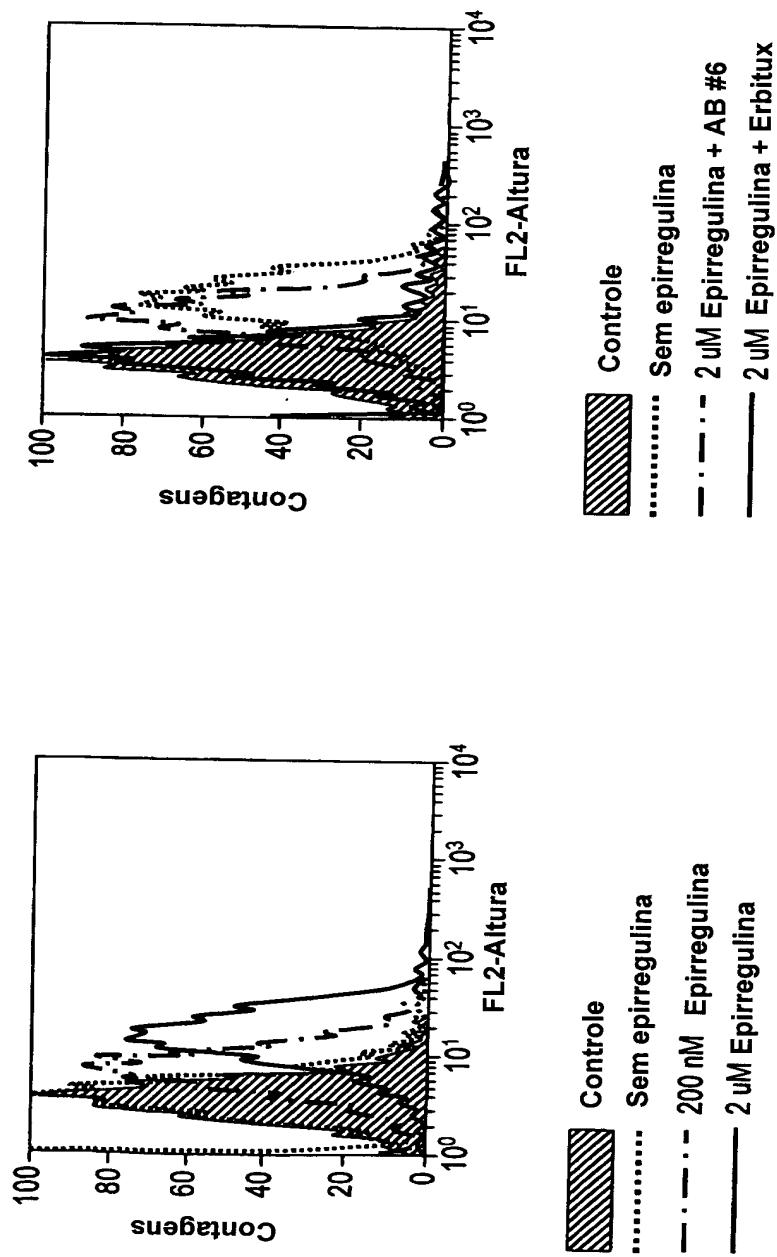


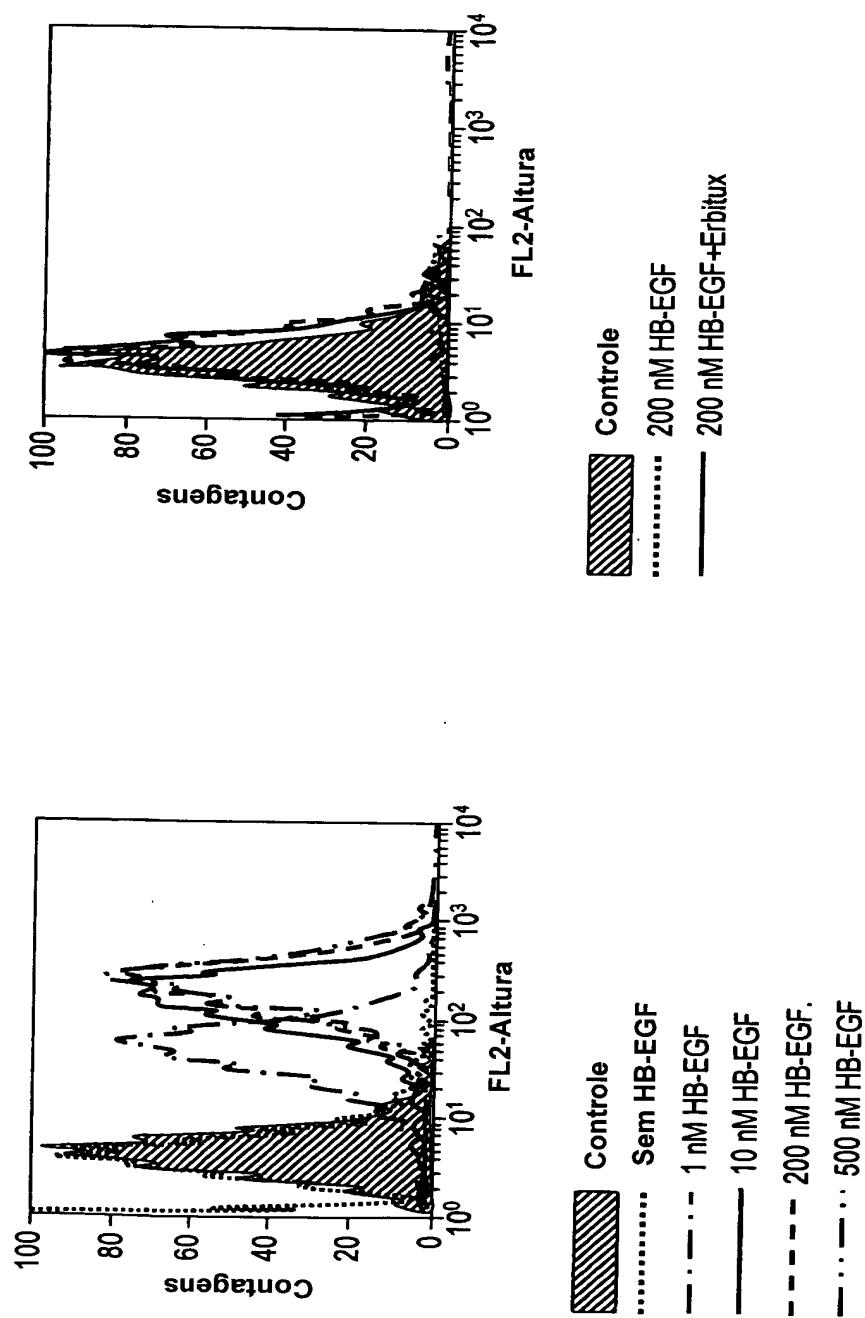
Fig. 18A

Fig. 18B

Ligação de Epirregulina a ADR

Bloqueio da Ligação da Epirregulina a ADR pelo Ab #6 e Erbitux





**Sequência de aminoácidos VH de Ab #6 (SEQ ID NO:1)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISSS  
GGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFD  
YWQGQTLTVSS

**Sequência de aminoácidos Otimizadas pelo Códon VH de Ab #6 (SEQ ID NO:2)**

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIYEVQR  
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVFGGGTKVTVL

**Sequência de aminoácidos VH de Ab #3 (SEQ ID NO:3)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPS  
GGATRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDV  
WGQGQTLTVSS

**Sequência de aminoácidos VL de Ab #3 (SEQ ID NO:4)**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSDSNIGRNYIYWYQQFPGTAPKLLIYRNNQRP  
SGVPDRISGSKSGTSASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

**Sequência de aminoácidos VH de Ab #14 (SEQ ID NO:5)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS  
GGHTKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLVD  
AFDIWGQGTMVTVSS

**Sequência de aminoácidos VL de Ab #14 (SEQ ID NO:6)**

QEYLTQPPSVVYPGQTASITCSGDSLQQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLMYDKRPP  
SEIPERFSGNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSSTYVFGGTGKVTVL

**Sequência de aminoácidos VH de Ab #17 (SEQ ID NO:35)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS  
GGITVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDV  
WGQGTTTVSS

**Sequência de aminoácidos VL de Ab #17 (SEQ ID NO:36)**

QDIQMTQSPSSLASAVGDRITITCQASQDIDDSLNWYQQKPGKAPRLLIYDASNLE  
TGVPPRFSGSGSGTDFTRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

**Sequência de aminoácidos VH de Ab #19 (SEQ ID NO:37)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWWVRQAPGKGLEWVSYIGSS  
GGPTYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDS  
WGQGTLTVSS

**Sequência de aminoácidos VL de Ab #19 (SEQ ID NO:38)**

QEYLTQPAVGSPGQSITISCTGTSSDGRWNIVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRF  
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWVFGGGTKLTVL

*Fig. 21A*

Ab # 6 VH CDR1 (SEQ ID NO:7)  
HYVMA

Ab # 6 VH CDR2 (SEQ ID NO:8)  
SISSSGGWTLYADSVKG

Ab # 6 VH CDR3 (SEQ ID NO:9)  
GLKMATIFDY

Ab # 6 VL CDR1 (SEQ ID NO:10)  
TGTSSDVGSYNVVS

Ab # 6 VL CDR2 (SEQ ID NO:11)  
EVSRQPS

Ab # 6 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)  
CSYAGSSIFVI

Ab # 3 VH CDR1 (SEQ ID NO:13)  
AYNMR

Ab # 3 VH CDR2 (SEQ ID NO:14)  
VIYPSGGATRYADSVKG

Ab # 3 VH CDR3 (SEQ ID NO:15)  
GYYYYGMDV

Ab # 3 VL CDR1 (SEQ ID NO:16)  
SGSDSNIGRNYTY

Ab # 3 VL CDR2 (SEQ ID NO:17)  
RNNQRPS

Ab # 3 VL CDR3 (SEQ ID NO:18)  
GTWDDSLSGPV

*Fig. 21B*

Ab # 14 VH CDR1 (SEQ ID NO:19)  
AYGMG

Ab # 14 VH CDR2 (SEQ ID NO:20)  
YISPSGGHTKYADSVKG

Ab # 14 VH CDR3 (SEQ ID NO:21)  
VLETGLLVDAFDI

Ab # 14 VL CDR1 (SEQ ID NO:22)  
SGDQLGSKFVS

Ab # 14 VL CDR2 (SEQ ID NO:23)  
YKDKRRPS

Ab # 14 VL CDR3 (SEQ ID NO:24)  
QAWDSSTYVV

Ab # 17 VH CDR1 (SEQ ID NO:39)  
WYGMG

Ab # 17 VH CDR2 (SEQ ID NO:40)  
YISPSGGITVYADSVKG

Ab # 17 VH CDR3 (SEQ ID NO:41)  
LNYYYGLDV

Ab # 17 VL CDR1 (SEQ ID NO:42)  
QASQDIGDSLN

Ab # 17 VL CDR2 (SEQ ID NO:43)  
DASNLET

Ab # 17 VL CDR3 (SEQ ID NO:44)  
QQSANAPFT

Ab # 19 VH CDR1 (SEQ ID NO:45)  
RYGMW

Ab # 19 VH CDR2 (SEQ ID NO:46)  
YIGSSGGPTYYVDSVKG

Ab # 19 VH CDR3 (SEQ ID NO:47)  
GRGTPYYFDS

Ab # 19 VL CDR1 (SEQ ID NO:48)  
TGTSSDIGRWNIVS

Ab # 19 VL CDR2 (SEQ ID NO:49)  
DVSNRPS

Ab # 19 VL CDR3 (SEQ ID NO:50)  
SSYTSSSTWV

*Fig. 21C*

**Sequência de aminoácidos de Pré-otimização de VL Ab #6 (SEQ ID NO:25)**

gaggtcagctgctggagagcggcggagggctggccagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccagcggcttcac  
cttcagccactacgtatggcctgggtgcggcaggccccaggcaaggccctgaaatgggtgtccagcatcagcagcagcggcgg  
ctggaccctgtacgcccacagcgtgaagggcaggttaccatcagcagggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaac  
agcctgagggccgaggacaccgcgtgtactactgcaccagggcctgaaagatggccaccatctcgactactgggcccaggc  
accctggtgaccgtgagcagc

**Sequência de aminoácidos de Pré-otimização de VL Ab #6 (SEQ ID NO:26)**

cagtccgcctgacccagccgcacgcgtgagcggcagcccaggccagagcatcaccatcagctgcaccggcaccaggcagcga  
cgtggcagctacaacgtggtcctggatcagcagcaccccgcaaggccccaaagctgtatctacgagggtgtcccgagg  
cccagcggcgtgagcaacagggtcagcggcagcaagagcggcaacaccgcctgaccatcagcggcctgcagaccgagg  
acgaggccgactactgctgcagctacgcggcagcagcatctcgatctcgccggagggaccaaggtgaccgtccta

**Sequência de aminoácidos de Pré-otimização de VL Ab #3(SEQ ID NO:27)**

gaggtcagctgctggaaagcggcggagggctggcagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccagcggcttcac  
cttcagccctacaacatgagatgggtgcggcaggccccaggcaaggccctgaaatgggtgtccgtgatctacccagcggcgg  
agccaccagatacgcgcacagcgtgaagggcaggttaccatcagcagggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaa  
cagcctgagggccgaggacaccgcgtgtactactgcgccagggctactactacggcatggacgtgtgggcccaggcac  
cctggtgaccgtgagcagc

**Sequência de aminoácidos de Pré-otimização do Codon VL Ab #6 (SEQ ID NO:28)**

cagagcgtgctgacccagccccaaagcgcacgcggcaccaggccagagggtaccatcagctgcagcggcagcgcacagca  
acatcggcaggaactacatctactggatcagcagtcccgccaccggccccaaagctgtatctacaggaacaaccagaggccc  
agcggcgtgcccgcacaggatcagcggcagcaagagcggcaccagcggccatcagcggcctgagaagcggaggac  
gaggccgagtaccactgcggcacctgggacgcacgcctgagcggcccagtgtcggcggagggaccaagctgaccgtccta

*Fig. 22A*

## Sequência de ácido nucleico de VH Ab #14 (SEQ ID NO:29)

gaagttcaattgttagagtctggcggtctgttcagccctgggttacgttttgcgtgcctccggattcactttctt  
gcttacggatgggtgggttcgccaagctccgttaagggtttggagtggttctatatcttccttcgtggccatactaag  
tatgctgactccgtaaaggctcgcttactatcttagagacaactctaagaatactctacttgcagatgaacagcttaaggc  
tgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagtactggaaactggcttattgggtatgcctttgatatctggggccaaaggaca  
atggtcaccgtctcaagc

## Sequência de ácido nucleico de VL Ab #14 (SEQ ID NO:30)

cgtacgaattgactcagccacccctcagtgtccgtgtaccaggacagacagccagcatcacctgctggagatcaattggg  
gagtaaatttgttccctggtatcagcagaggccaggccagttccctgtgttggatcgtataaaagataaaaggccggccgtcaga  
gatccctgagcgattctctggctccaactctggaaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggctatacatgaggct  
gactattatgtcaggcgtggacagcagcacttgcgttccggcacttggaccatcaccgtccctta

## Sequência de ácido nucleico de pré-otimização de VH Ab #6 (SEQ ID NO:31)

gaagttcaattgttagagtctggcggcttgcagcctgggtcttacgtcttcttgcgctgttccggattcactttctt  
cattacgttatggctgggtcgccaaagctccgttaaagggttggagtgggttcttctatcttcttctgttggctggactttat  
gctgactccgttaaagggtcgcttactatcttagagacaactctaagaactcttacttgcagatgaacagcttaagggtctg  
aggacacagccgttattactgtactagaggctcaagatggctacaattttgactactggggccagggcacctggtcaccg  
tctcaagc

Sequência de ácido nucleico de pré-otimização de VL Ab #6 (SEQ ID NO:32)

cagagcgtttgactcagcctgcctccgtctgggtctcctggacagtgcataccatctcctgcactggaaaccaggcagtgttggggagtataatgttgtctcctggtaccaacaacaccaggcaaagccccaaactcatcattatgaggtcagtgcaggccctcagggttctaatcgctctctggctccaagtcggcaacacggccctccctgacaatctctggctccagactgaggacgaggctgattattactgcgtcatatgcaggtagtagtatttcgtatattcggcggagggaccaagggtgaccgtccata

Sequência de ácido nucleico de pré-optimização de VH Ab #3 (SEQ ID NO:33)

gaagttcaattgttagagtctggcggcttgcagcctgggtttacgtttcttgcgtgcctccggattcactttctt  
gcttacaatatgcgtgggttcgcacaagctcctggtaaagggttggagtggtttctgttatctatcctctggcgctactcggt  
atgctgactccgttaaagggtcgcttcaactatcttagagacaactctaagaactctctacttgcatgtacacgcttaagggt  
gaggacacggccgtgttattactgtcgagagggtaactactacggatggacgtctggggcaaggcaccctggtcaccg  
tctcaagc

Sequência de ácido nucleico de pré-otimização de VL Ab #3(SEQ ID NO:34)

Fig. 22B

- **Ab #6 VLb:**
- QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPK  
LMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYA  
GSSIFVIFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:51)
- **Ab #17 VK1b:**
- QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSLNWYQQKPGKAPRLL  
IYDASNLETGVPPRFSGSGSGTDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAP  
FTFGPGTKVDIR (SEQ ID NO:52)
- **Ab #19 VL2b:**
- QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDGRWNIVSWYQQHPGKAPK  
LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLTS  
SSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:53)

*Fig. 23*

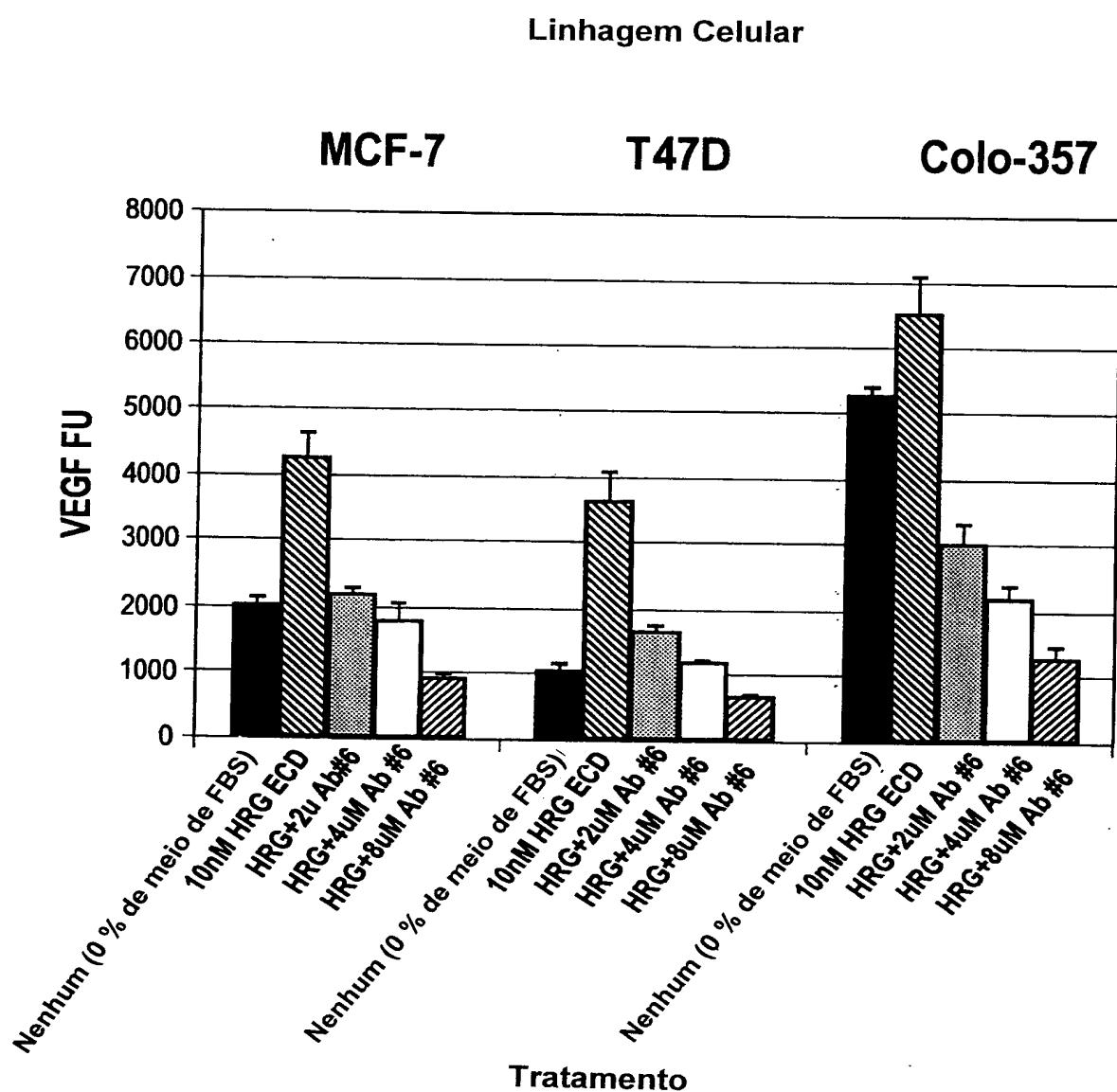


Fig. 24A

Linhagem Celular

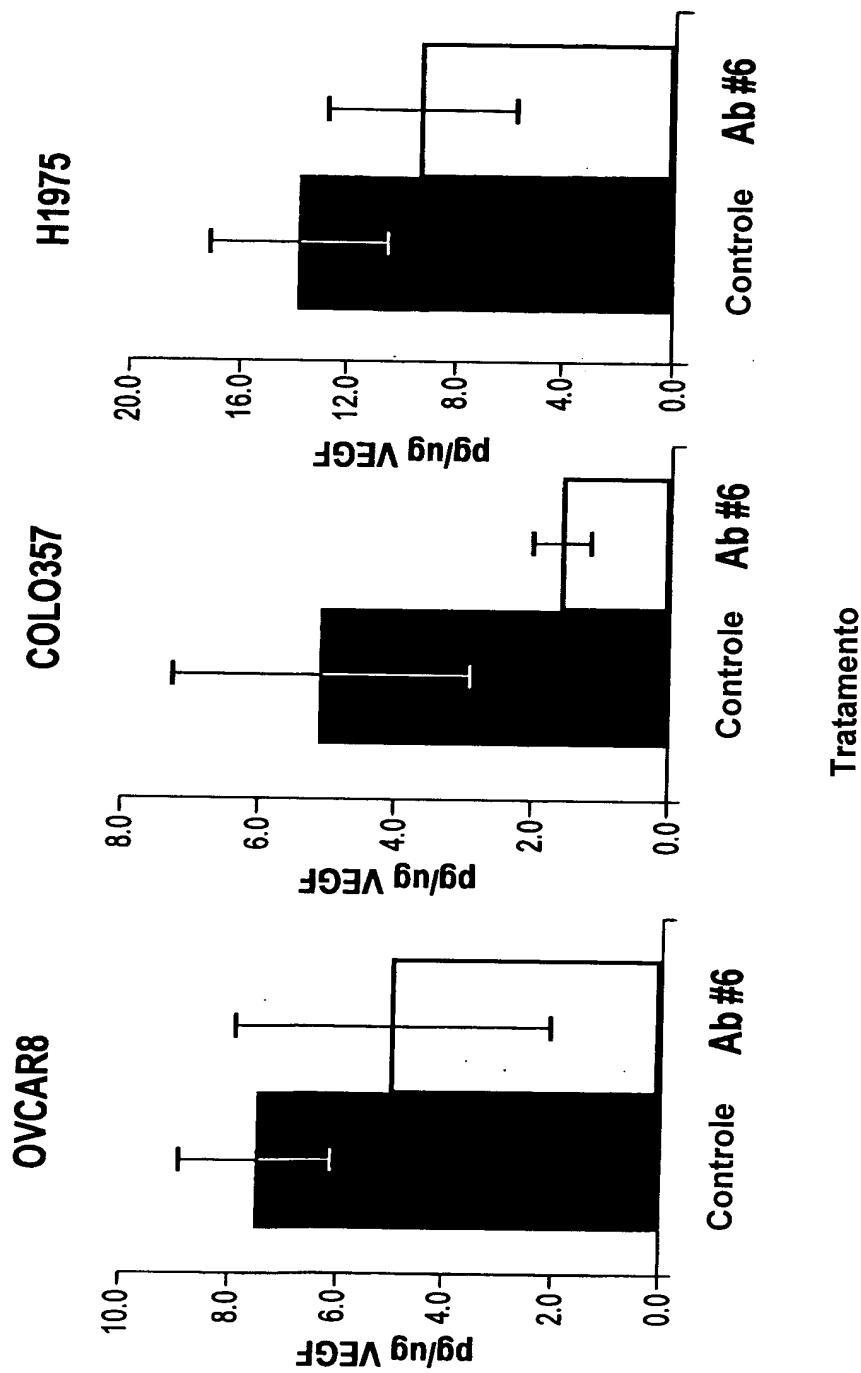
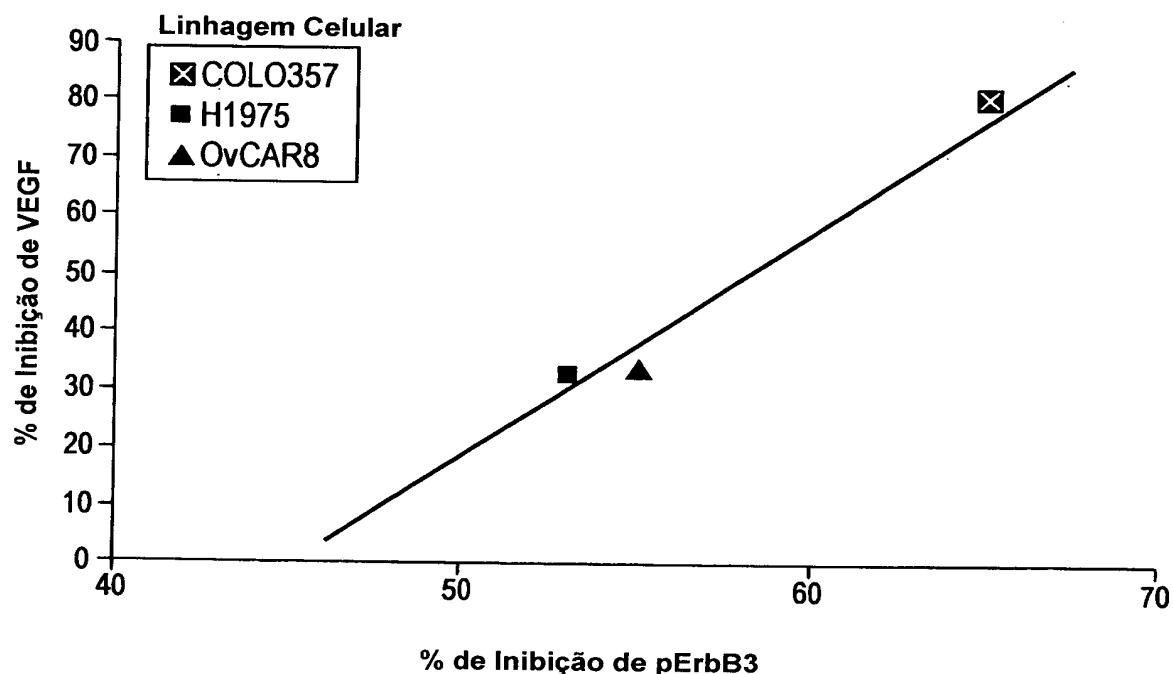


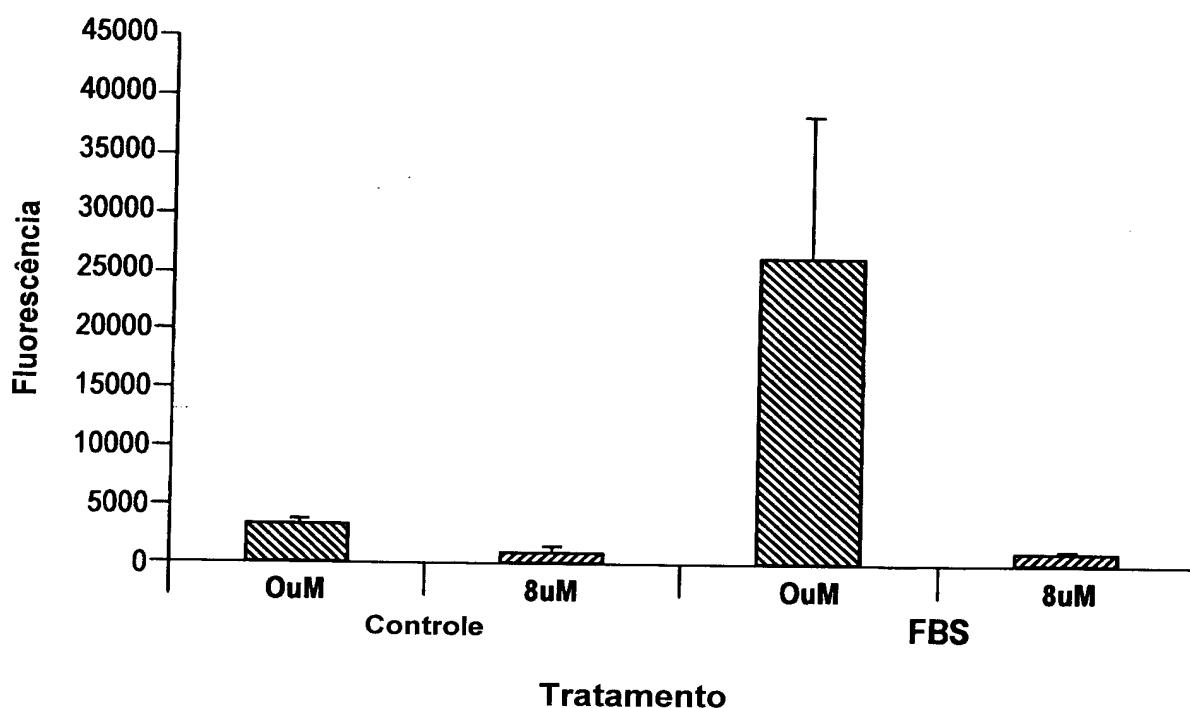
Fig. 24B

**Correlação da Inibição de fosfoErbB3 e a Inibição da Secreção de VEGF**

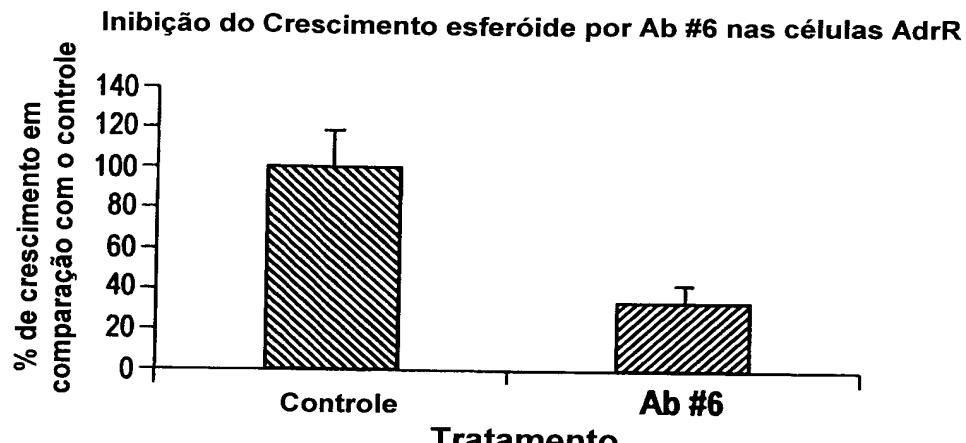
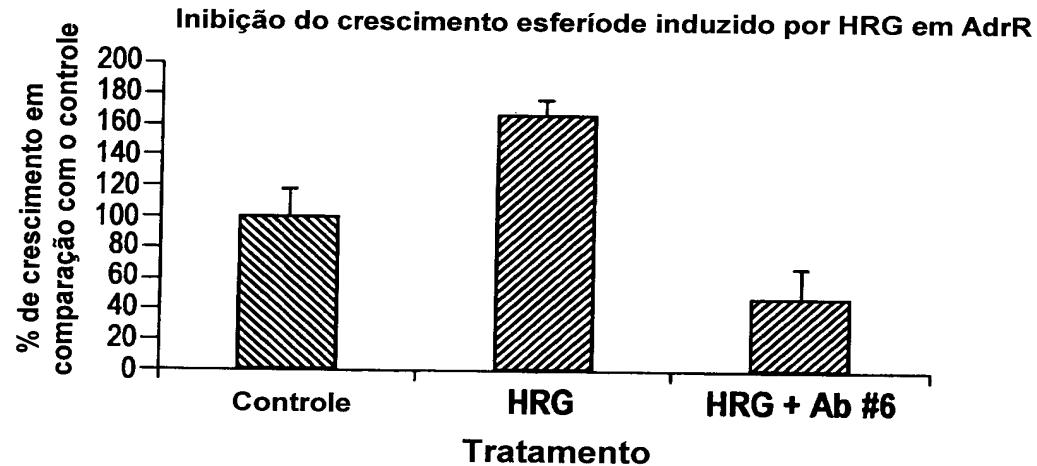
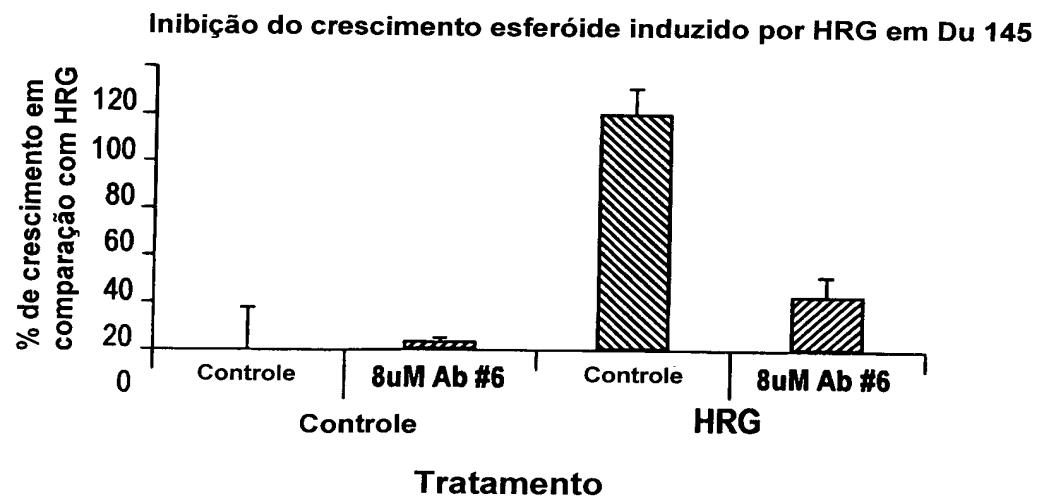


*Fig. 24C*

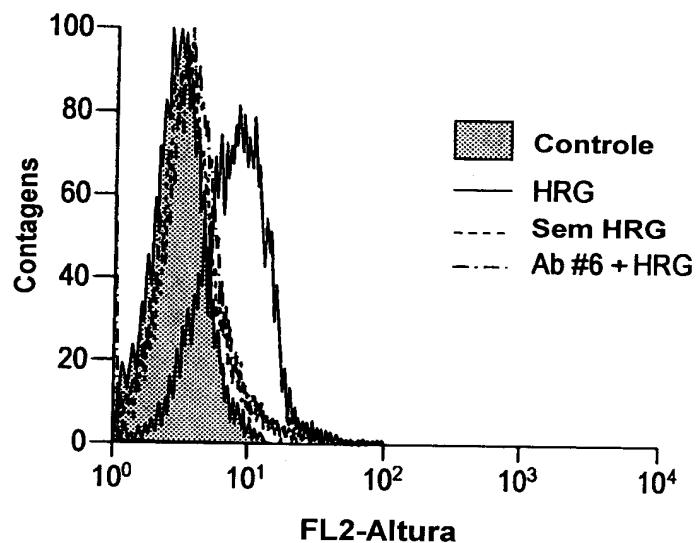
**Efeito do Ab #6 sobre a Migração Celular**



*Fig. 25*

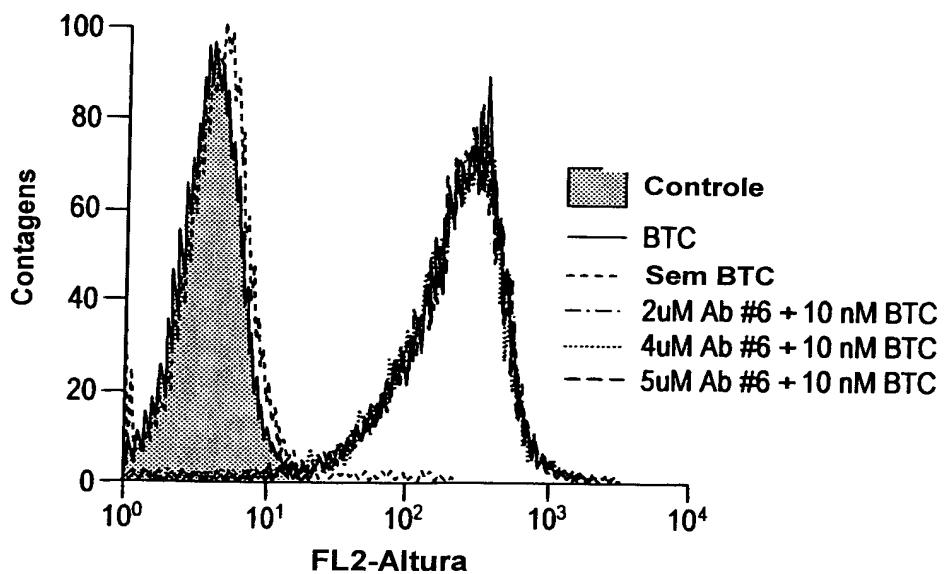
*Fig. 26A**Fig. 26B**Fig. 26C*

**Efeito do Ab #6 sobre a ligação de HRG às células AdrR**



*Fig. 27A*

**Efeito do Ab #6 sobre a ligação de BTC às células AdrR**



*Fig. 27B*

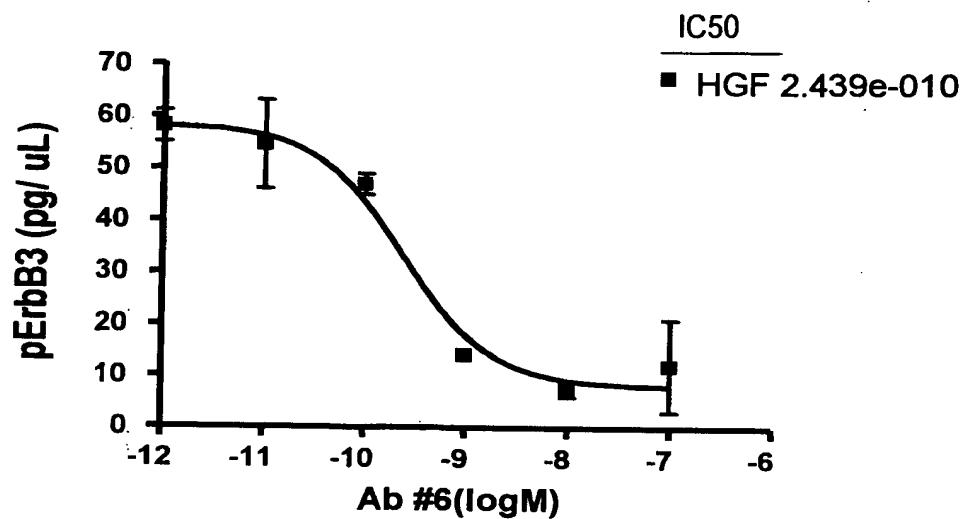


Fig. 28

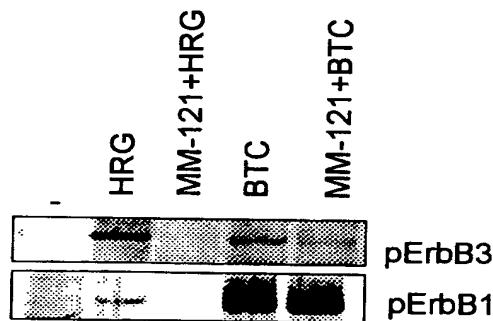


Fig. 29A

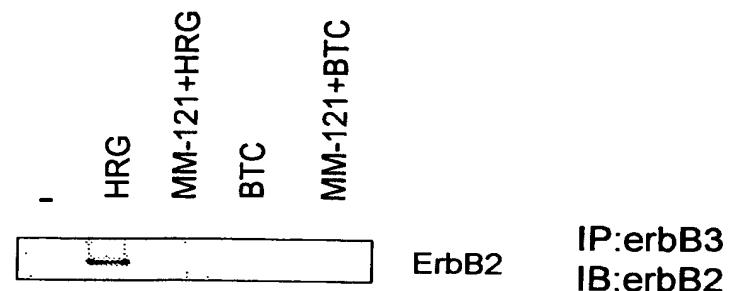
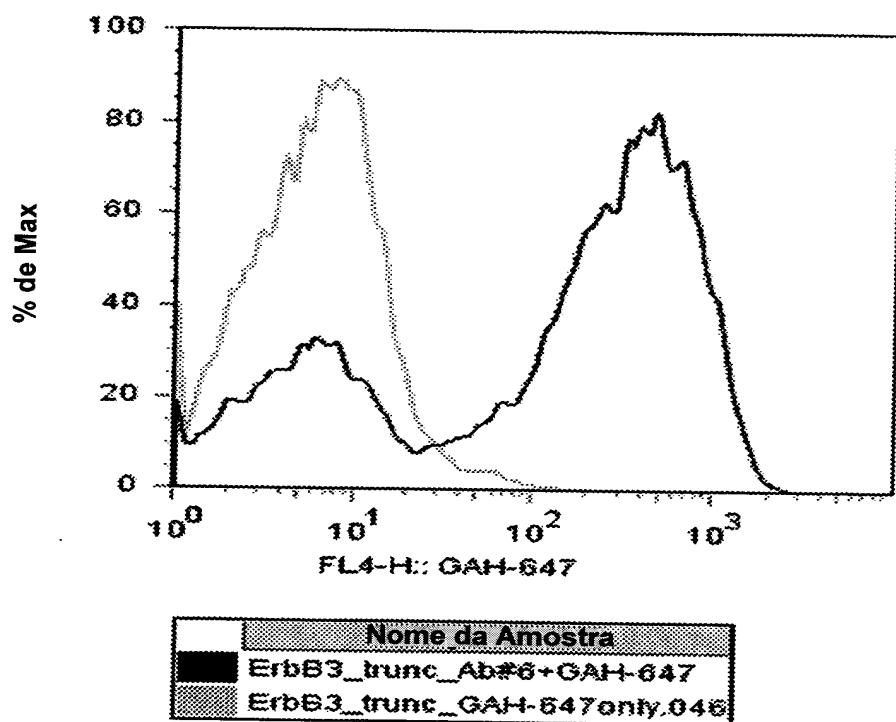


Fig. 29B

Fig. 30



## RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA,  
5 HIBRIDOMA, KIT, USO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU PORÇÃO DO MESMO QUE SE LIGA AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UM CÂNCER ASSOCIADO COM ErbB3 EM UM PACIENTE, E, ANTICORPO”

A presente invenção fornece uma nova classe de anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor de ErbB3 e inibem várias funções do ErbB3. Por exemplo, os anticorpos aqui descritos são capazes de ligarem-se ao ErbB3 e de inibirem a fosforilação do receptor mediada pelo ligando semelhante ao EGF.