

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.07.15	(73) Titular(es): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridade(s): 2004.07.22 US 590202 P	1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.04.11	94080-4990	US
(45) Data e BPI da concessão: 2014.08.20 211/2014	(72) Inventor(es): YUNG-HSIANG KAO MARTIN VANDERLAAN	US US
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO DE ANTICORPO HER2**

(57) Resumo:

DESCREVE-SE UMA COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE ANTICORPO HER2 DE ESPÉCIE PRINCIPAL QUE SE LIGA AO DOMÍNIO II DE HER2 E UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO MESMO QUE COMPREENDE UMA EXTENSÃO LÍDER AMINO-TERMINAL. TAMBÉM SE DESCREVEM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM A COMPOSIÇÃO E UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS PARA A COMPOSIÇÃO.

RESUMO

"COMPOSIÇÃO DE ANTICORPO HER2"

Descreve-se uma composição que compreende anticorpo HER2 de espécie principal que se liga ao domínio II de HER2 e uma variante de sequência de aminoácidos do mesmo que compreende uma extensão líder amino-terminal. Também se descrevem formulações farmacêuticas que compreendem a composição e utilizações terapêuticas para a composição.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO DE ANTICORPO HER2"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a uma composição que compreende um anticorpo HER2 de espécie principal que se liga ao domínio II de HER2 e variante de sequência de aminoácidos do mesmo que compreende extensão líder amino-terminal. A presente invenção também se refere a formulações farmacêuticas que compreendem a composição e utilizações terapêuticas para a composição. A invenção é como foi definida nas reivindicações.

Antecedentes da Invenção

Anticorpos HER2

A família HER de recetores tirosina quinases são mediadores importantes do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. A família de recetores inclui quatro membros distintos, que incluem recetor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB1 ou HER1), HER2 (ErbB2 ou p185^{neu}), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tiro2).

O EGFR, codificado pelo gene *erbB1*, foi implicado nas causas de malignidade humana. Particularmente, observou-se um aumento da expressão de EGFR em cancro de mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago, bem como glioblastomas. O aumento da expressão de recetor EGFR é frequentemente associado à maior produção do ligando de EGFR, fator alfa de crescimento de transformação (TGF- α), pelas mesmas células tumorais, o que resulta na ativação de recetores por meio de processo estimulante autócrino. Baselga e Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64: 127-154 (1994). Os anticorpos monoclonais dirigidos contra o EGFR ou seus

ligandos, TGF- α e EGF, foram avaliados como agentes terapêuticos no tratamento dessas malignidades. Veja-se, por exemplo, Baselga e Mendelsohn, acima; Masui et al., *Cancer Research* 44: 1002-1007 (1984); e Wu et al., *J. Clin. Invest.* 95: 1897- 1905 (1995).

O segundo membro da família de HER, p185^{neu}, foi identificado originalmente como o produto do gene de transformação de neuroblastomas de ratos tratados quimicamente. A forma ativada do proto-oncogene *neu* resulta de mutação pontual (valina em ácido glutâmico) na região de transmembrana da proteína codificada. A amplificação do homólogo humano de *neu* é observada em cânceros de mama e ovário e correlaciona-se com mau prognóstico (Slamon et al., *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244: 707-712 (1989); e Patente US nº 4.968.603). Até o momento nenhuma mutação pontual análoga à do proto-oncogene *neu* foi relatada para tumores humanos. A sobreexpressão de HER2 (frequente mas não uniformemente devido à amplificação genética) também foi observada em outros carcinomas, que incluem carcinomas do estômago, endométrio, glândulas salivares, pulmão, rim, cólon, tireoide, pâncreas e bexiga. Veja-se, entre outros, King et al., *Science*, 229: 974 (1985); Yokota et al., *Lancet*. 1: 765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3: 21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4: 81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol*, 38: 364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50: 421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50: 5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49: 6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3: 254-257 (1990); Aasland et al., *Br. J. Cancer* 57: 358-363 (1988); Williams et al., *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); e McCann et al., *Cancer*, 65: 88-92 (1990). HER2 pode ser sobreexpresso em cancro da próstata (Gu et al., *Cancer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross et al., *Hum. Pathol.* 28: 827-

33 (1997); Ross et al., *Cancer* 79: 2162-70 (1997); e Sadasivan et al., *J. Urol.* 150: 126-31 (1993)).

Foram descritos anticorpos dirigidos contra os produtos de proteína p185^{neu} de rato e HER2 humana. Drebin e colegas levantaram anticorpos contra o produto genético neu de rato, p185^{neu}. Veja-se, por exemplo, Drebin et al., *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991); e documento WO 94/22478. Drebin et al., *Oncogene* 2: 273-277 (1988) relatam que misturas de anticorpos reativos com duas regiões distintas de p185^{neu} resultam em efeitos anti-tumorais sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas com neu implantadas em ratinhos brutos. Veja-se também a Patente US nº 5.824.311 emitida em vinte de Outubro de 1998.

Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9 (3): 1165-1172 (1989) descrevem a geração de um painel de anticorpos HER2 que foram caracterizados utilizando a linha de células de tumor de mama SK-BR-3. A proliferação celular relativa das células SK-BR-3 após a exposição aos anticorpos foi determinada por meio de manchas de violeta de cristal das monocamadas após 72 horas. Utilizando este teste, obteve-se inibição máxima com o anticorpo denominado 4D5, que inibiu a proliferação celular em 56 %. Outros anticorpos no quadro reduziram a proliferação celular em menor ponto neste teste. O anticorpo 4D5 foi adicionalmente considerado sensibilizando linhas de células de tumor de mama que sobreexpressam HER2 aos efeitos citotóxicos de TNF- α . Veja-se também a Patente US nº 5.677.171, emitida em 14 de Outubro de 1997. Os anticorpos HER2 discutidos em Hudziak et al. são adicionalmente caracterizados em Fendly et al., *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990); Kotts et al., *In vitro* 26 (3):59A (1990); Sarup et al., *Growth Regulation* 1: 72-82 (1991); Shepard et al., *J. Clin. Immunol.* 11 (3): 117-127 (1991); Kumar et al., *Mol. Cell. Biol.* 11 (2): 979-986 (1991); Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37:

255-263 (1993); Pietras et al., *Oncogene* 9: 1829- 1838 (1994); Vitetta et al., *Cancer Research* 54: 5301-5309 (1994); Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.* 269 (20): 14661-14665 (1994); Scott et al., *J. Biol. Chem.* 266: 14300-5 (1991); D'souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206 (1994); Lewis et al., *Cancer Research* 56: 1457-1465 (1996); e Schaefer et al., *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997).

Versão humanizada recombinante do anticorpo HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab ou HERCEPTIN®, Patente US nº 5.821.337) é clinicamente ativa em pacientes com câncros de mama metastáticos que sobreexpressam HER2 que receberam extensa terapêutica anti-câncer anterior (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 (1996)). Trastuzumab recebeu aprovação para comercialização da Food and Drug Administration em 25 de Setembro de 1998 para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático cujos tumores sobreexpressam a proteína HER2.

Outros anticorpos HER2 com diversas propriedades foram descritos em Tagliabue et al., *Int. J. Cancer* 47: 933-937 (1991); McKenzie et al., *Oncogene* 4: 543-548 (1989); Maier et al., *Cancer Res.* 51: 5361-5369 (1991); Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362 (1990); Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991); Bacus et al., *Cancer Research* 52: 2580- 2589 (1992); Xu et al., *Int. J. Cancer* 53: 401-408 (1993); documento WO 94/00136; Kasprzyk et al., *Cancer Research* 52: 2771-2776 (1992); Hancock et al., *Cancer Res.* 51: 4575-4580 (1991); Shawver et al., *Cancer Res.* 54: 1367-1373 (1994); Arteaga et al., *Cancer Res.* 54: 3758-3765 (1994); Harwerth et al., *J. Biol. Chem.* 267: 15160-15167 (1992); Patente US nº 5.783.186; e Klapper et al., *Oncogene* 14: 2099-2109 (1997).

O rastreamento de homologia resultou na identificação de dois outros membros da família de receptores de HER; HER3 (Patentes US nº 5.183.884 e 5.480.968, bem como Kraus et

al., *PNAS (USA)* 86: 9193- 9197 (1989)) e HER4 (Pedido de Patente EP nº 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746-1750 (1993); e Plowman *et al.*, *Nature* 366: 473-475 (1993)). Estes dois recetores exibem expressão maior sobre pelo menos algumas linhas de células de cancro de mama.

Os recetores de HER geralmente são encontrados em diversas combinações em células e acredita-se que a heterodimerização aumente a diversidade de reações celulares a uma série de ligandos de HER (Earp *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR é unido por seis ligandos diferentes; fator de crescimento epidérmico (EGF), fator alfa de crescimento de transformação (TGF- α), anfirregulina, fator de crescimento epidérmico de ligação a heparina (HB-EGF), betacelulina e epirregulina (Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11: 235-257 (1994)). Família de proteínas de herregulina resultantes da divisão alternativa de um único gene são ligandos para HER3 e HER4. A família de herregulina inclui alfa, beta e gama herregulinas (Holmes *et al.*, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); Patente US nº 5,641,869; e Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997); fatores de diferenciação neu (NDFs), fatores de crescimento glial (GGFs); recetor de acetilcolilna indutor de atividade (ARIA); e fator derivado de neurónios motores e sensoriais (SMDF). Para análise, veja-se Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11: 235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7: 247- 262 (1996) e Lee *et al.*, *Pharm. Rev.* 47: 51-85 (1995). Recentemente, foram identificados três ligandos de HER adicionais; neurregulina-2 (NRG-2), que se relata ligar a HER3 ou HER4 (Chang *et al.*, *Nature* 387: 509-512 (1997); e Carraway *et al.*, *Nature* 387: 512-516 (1997)); neurregulina-3 que se liga a HER4 (Zhang *et al.*, *PNAS (USA)* 94 (18): 9562-7 (1997)); e neurregulina-4 que se liga a HER4 (Harari *et al.*, *Oncogene* 18: 2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina e

epirregulina também se ligam a HER4.

Embora EGF e TGF não se liguem a HER2, EGF estimula EGFR e HER2 para formar heterodímero, que ativa EGFR e resulta em transfosforilação de HER2 no heterodímero. Dimerização e/ou transfosforilação aparentemente ativam a tirosina quinase de HER2. Veja-se Earp *et al.*, acima. De forma similar, quando HER2 é coexpresso com HER2, complexo de sinalização ativo é formado e anticorpos dirigidos a HER2 são capazes de romper esse complexo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994)). Além disso, a afinidade de HER3 para herregulina (HRG) é aumentada para estado de afinidade superior quando coexpresso com HER2. Veja-se também Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); e Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 1457- 1465 (1996) com relação ao complexo de proteína HER2-HER3. HER4, como HER3, forma complexo de sinalização ativo com HER2 (Carraway e Cantley, *Cell* 78: 5-8 (1994)).

Para dirigir o processo de sinalização de HER, rhuMab 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG®) foi desenvolvido como anticorpo humanizado que inibe a dimerização de HER2 com outros recetores de HER, de forma a inibir a ativação e fosforilação dirigida a ligando e ativação abaixo no fluxo dos processos AKT e RAS. Em teste de fase I de Pertuzumab como agente isolado para o tratamento de tumores sólidos, três pacientes com cancro do ovário avançado foram tratados com pertuzumab. Uma apresentou reação parcial durável e paciente adicional apresentou doença estável por quinze semanas. Agus *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22: 192, Resumo 771 (2003).

O local de ligação a antigénio de um Fab2C4 humanizado foi estudado usando mutagénesse por varrimento aleatório (Vajdos *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 320(2): 415-28, (2002)). O documento W001/00238 descreve a utilização de pertuzumab

para o tratamento de cancro da próstata. Foi sugerido que pertuzumab e trastuzumab sinergisticamente inibem a sobrevivência de células de cancro de mama (Nahta *et al.*, Cancer Research, 64:2343-2346, (2004)).

Composições de Variantes de Anticorpo

A Patente US nº 6.339.142 descreve uma composição de anticorpo HER2 que compreende uma mistura de anticorpo anti-HER2 e uma ou mais variantes ácidas do mesmo, em que a quantidade da(s) variante(s) ácida(s) é de menos de cerca de 25 %. Trastuzumab é o anticorpo HER2 exemplificado.

Reid *et al.*, Póster apresentado na conferência Well Characterized Biotech Pharmaceuticals (Janeiro de 2003), "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics", descreve uma composição de anticorpo IgG1 humanizado sem nome com heterogeneidades N-terminais devido a combinações de péptido de sinal VHS, glutamina N-terminal e ácido piroglutâmico na cadeia pesada do mesmo.

Reed *et al.*, Póster "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" apresentado na Conferência IBC Antibody Production (Fevereiro de 2002), relatam extensão VHS sobre a cadeia pesada de E25, anticorpo anti-IgE humanizado.

Rouse *et al.*, Póster apresentado na WCBP "'Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development" (6-9 de Janeiro de 2004), descrevem uma composição de anticorpo monoclonal com heterogeneidade N-terminal resultante de resíduos de péptido de sinal $^{-3}$ AHS ou $^{-2}$ HS na cadeia leve do mesmo.

Numa apresentação na Reunião do IBC (Setembro de 2000), "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals," Jill Porter discutiu

uma forma de eluição retardada de ZENAPAX™ com três resíduos de aminoácidos adicionais na cadeia pesada do mesmo.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a uma composição que compreende: (a) um anticorpo HER2 de espécie principal que se liga ao domínio II de HER2, e compreende uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável proporcionada como SEQ ID NO:3 e uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável proporcionado como SEQ ID NO:4; e (b) uma variante de anticorpo que compreende o anticorpo HER2 de espécie principal e uma extensão líder amino-terminal que compreende VHS- numa cadeia leve da variante de anticorpo, em que 5 de % a cerca de 15 % das moléculas de anticorpo na composição compreendem a extensão líder amino-terminal, conforme quantificada pela análise de permuta de catiões.

A invenção refere-se ainda a um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos na SEQ ID NO. 23, ou uma variante desamidada e/ou oxidada do mesmo, como estando incluído num anticorpo que compreende (a) uma cadeia leve que compreende esse polipéptido, e (b) uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 24, e uma variante desamidada e/ou oxidada de SEQ ID NO. 16 ou SEQ ID NO. 24.

A invenção também se refere a uma formulação farmacêutica que compreende a composição num portador farmaceuticamente aceitável, útil para tratar o cancro que expressa HER2 num paciente por meio da administração da formulação farmacêutica ao paciente numa quantidade eficaz para tratar o cancro.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 proporciona um esquema da estrutura da proteína HER2 e sequências de aminoácidos para os Domínios I a IV (SEQ ID N° 19 a 22, respetivamente) do seu domínio extracelular.

As Figuras 2A e 2B ilustram alinhamentos das sequências de aminoácidos dos domínios leve variável (V_L) (Fig. 2A) e pesado variável (V_H) (Fig. 2B) de anticorpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID N° 1 e 2, respetivamente); domínios V_L e V_H de 2C4 humanizado versão 574 (SEQ ID N° 3 e 4, respetivamente) e estruturas de consenso de V_L e V_H humana (hum κ 1, subgrupo capa leve I; humIII, subgrupo de cadeia pesada III) (SEQ ID N° 5 e 6, respetivamente). Os asteriscos identificam diferenças entre 2C4 humanizado versão 574 e anticorpo monoclonal murino 2C4 ou entre 2C4 humanizado versão 574 e a estrutura humana. As Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs) encontram-se entre parênteses.

As Figuras 3A e 3B exibem a sequência de aminoácidos da cadeia leve de Pertuzumab (SEQ ID N° 15) e cadeia pesada (SEQ ID N° 16). As CDRs são exibidas em negrito. A fração de hidrato de carbono é ligada a Asn 299 da cadeia pesada.

As Figuras 4A e 4B exibem as sequências de aminoácidos da cadeia leve de Pertuzumab (SEQ ID N° 17) e cadeia pesada, em que cada qual inclui uma sequência de péptido de sinal amino terminal intata (SEQ ID N° 18). A Figura 5 ilustra esquematicamente a ligação a 2C4 no local de ligação heterodimérico de HER2, de forma a evitar a heterodimerização com EGFR ou HER3 ativado.

A Figura 6 ilustra o acoplamento de HBR2/HER3 aos processos de MAPK e Akt.

A Figura 7 compara a atividade de Trastuzumab e

Pertuzumab.

As Figuras 8A e 8B exibem espectros de massa reconstruídos de cadeia leve de Pertuzumab reduzido (Fig. 8A) e cadeia pesada (Fig. 8B).

As Figuras 9A e 9B ilustram análise de cromatografia de permuta de catiões de Pertuzumab nativo (Fig. 9A) e Pertuzumab digerido por CPB (Fig. 9B).

A Figura 10 exhibe análise cromatográfica de exclusão por tamanho de Pertuzumab.

As Figuras 11A e 11B exibem uma análise de CE-SDS-LIF de Pertuzumab reduzido (Fig. 11A) e Pertuzumab intato (Fig. 11B).

As Figuras 12A e 12B ilustram mapas de péptidos tripticos de Pertuzumab (Fig. 12A) e mapas de péptidos LYS-C de Pertuzumab (Fig. 12B).

A Figura 13 exhibe análise de CE de oligossacáridos N-ligados libertados de Pertuzumab.

A Figura 14A e 14B exibem estruturas de oligossacáridos comumente observadas em anticorpos IgG.

A Figura 15 ilustra espectros de massa de MALDI-TOF de modo positivo de oligossacáridos neutros libertados de Pertuzumab.

As Figuras 16A e 16B exibem a sequência de aminoácidos da cadeia leve de Trastuzumab (SEQ ID N° 13) e cadeia pesada (SEQ ID N° 14).

As Figuras 17A e 17B ilustram uma sequência de cadeia leve de Pertuzumab variante (SEQ ID N° 23) e uma sequência de cadeia pesada de Pertuzumab variante (SEQ ID N° 24).

Descrição Pormenorizada das Formas de Realização Preferidas

I. Definições

O termo "anticorpo de espécie principal" no presente

documento indica a estrutura de sequência de aminoácidos de anticorpos em composição que é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição. O anticorpo de espécie principal é um anticorpo HER2 que se liga ao Domínio II de HER2 e compreende as sequências e aminoácidos leve e pesada variável nas SEQ ID N° 3 e 4 e, de preferência, compreende a sequência de aminoácidos de cadeia leve e cadeia pesada nas SEQ ID N° 15 e 16 (Pertuzumab).

Um anticorpo de "variante de sequência de aminoácidos" no presente documento é um anticorpo com uma sequência de aminoácidos que difere de um anticorpo de espécie principal.

Exemplos de variantes de sequências de aminoácidos no presente documento incluem variante ácida (tal como variante de anticorpo desamidado), variante básica, anticorpo com extensão líder amino-terminal (tal como VHS-) sobre uma ou duas cadeias leves do mesmo, anticorpo com um resíduo de lisina C-terminal sobre uma ou duas cadeias pesadas do mesmo, anticorpo com um ou mais resíduos de metionina oxidados, etc. e inclui combinações de variações para as sequências de aminoácidos de cadeias leve e/ou pesada. A variante de anticorpo de interesse específico no presente documento é o anticorpo que compreende extensão líder amino-terminal sobre uma ou duas cadeias leves do mesmo, que opcionalmente também compreende outras diferenças de glicosilação e/ou sequência de aminoácidos relativas ao anticorpo da espécie principal.

Um anticorpo de "variante de glicosilação" no presente documento é um anticorpo com uma ou mais frações de hidrato de carbono a ele ligadas que diferem de uma ou mais frações de hidrato de carbono ligadas a um anticorpo de espécie principal. Exemplos de variantes de glicosilação no presente documento incluem anticorpo com uma estrutura de oligossacárido G1 ou G2, em vez de uma estrutura de

oligossacárido GO, ligada a uma região Fc do mesmo, anticorpo com uma ou duas frações de hidrato de carbono ligadas a uma ou duas cadeias leves do mesmo, anticorpo sem hidrato de carbono ligado a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo etc., bem como combinações dessas alterações de glicosilação.

Quando o anticorpo possuir uma região Fc, uma estrutura de oligossacárido tal como a exibida nas Figuras 14A e 14B do presente documento pode ser ligada a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, tal como no resíduo 299. Para Pertuzumab, GO era a estrutura de oligossacárido predominante, com outras estruturas de oligossacáridos tais como GO-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1 (1- 6), G1 (1-3) e G2 sendo encontradas em quantidades menores na composição de Pertuzumab.

A não ser que indicado de outro modo, uma "estrutura de oligossacárido G1" no presente documento inclui estruturas G1 (1-6) e G1 (1-3).

Uma "extensão líder amino-terminal" no presente documento indica um ou mais resíduos de aminoácidos da sequência líder amino-terminal que estão presentes no terminal amino de qualquer uma ou mais cadeias pesada ou leve de anticorpo. Um exemplo de extensão líder amino-terminal compreende ou consiste em três resíduos de aminoácidos, VHS, presentes sobre uma ou as duas cadeias leves de variante de anticorpo.

Um anticorpo "desamidado" é aquele em que um ou mais resíduos de asparagina do mesmo foi derivado, tal como em ácido aspártico, succinimida ou ácido iso-aspártico.

"Homologia" é definida como o percentual de resíduos na variante de sequência de aminoácidos que são idênticos após o alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se for necessário, para atingir o percentual máximo de homologia. Os métodos e programas de computador para o alinhamento são bem conhecidos na técnica. Um desses

programas de computador é "Align 2", de autoria da Genentech, Inc., que foi depositado com a documentação de usuário no Escritório de Direitos Autorais dos Estados Unidos, Washington DC 20559, Estados Unidos, em 10 de Dezembro de 1991.

Para os propósitos do presente documento, "análise de permuta de catiões" indica qualquer método por meio do qual uma composição que compreende dois ou mais compostos é separada com base em diferenças de carga utilizando permutador de catiões. Permutador de catiões geralmente compreende grupos carregados negativamente e covalentemente unidos. Preferentemente, o permutador de catiões do presente é permutador de catiões fraco e/ou compreende grupo funcional carboxilato, tal como a coluna de permuta de catiões PROPAC WCX-10™ vendida pela Dionex.

Um "recetor de HER" é tirosina quinase de proteína recetora que pertence à família de recetores de HER e inclui recetores de EGFR, HER2, HER3 e HER4 e outros membros desta família a serem identificados no futuro. O recetor de HER geralmente compreenderá um domínio extracelular, que pode unir um ligando de HER; um domínio de transmembrana lipofílica; um domínio de tirosina quinase intracelular conservado; e um domínio de sinalização carboxil-terminal que abriga vários resíduos de tirosina que podem ser fosforilados. Preferentemente, o recetor de HER é recetor de HER humano de sequência nativa.

O domínio extracelular de HER2 compreende quatro domínios, Domínio I (resíduos de aminoácidos de cerca de 1 a 195), Domínio II (resíduos de aminoácidos de cerca de 196 a 319), Domínio III (resíduos de aminoácidos de cerca de 320 a 488) e Domínio IV (resíduos de aminoácidos de cerca de 489 a 630) (numeração de resíduos sem péptido de sinal). Veja-se Garret *et al.*, *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *et al.*, *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004), ou Plowman *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 90: 1746-1750 (1993). Veja-se também a Fig. 1 do presente documento.

Os termos "ErbB1", "HER1", "recetor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são utilizados de forma intercambiável no presente documento e designam EGFR conforme descrito, por exemplo, em Carpenter *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 56: 881-914 (1987), incluindo suas formas mutantes de ocorrência natural (tais como EGFR mutante de exclusão como em Humphrey *et al.*, *PNAS (USA)* 87: 4207-4211 (1990)). *erbB1* designa o gene que codifica o produto de proteína EGFR.

Os termos "ErbB2" e "HER2" são utilizados de forma intercambiável no presente documento e designam a proteína HER2 humana descrita, por exemplo, em Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82: 6497-6501 (1985) e Yamamoto *et al.*, *Nature* 319: 230-234 (1986) (acesso Genebank nº X03363). O termo "erbB2" designa o gene que codifica ErbB2 humano e "neu" designa o gene que codifica p185^{neu} de rato. HER2 preferido é HER2 humano de sequência nativa.

"ErbB3" e "HER3" designam o polipéptido recetor conforme descrito, por exemplo, nas Patentes US nº 5.183.884 e 5.480.968, bem como Kraus *et al.*, *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989).

Os termos "ErbB4" e "HER4" designam no presente o polipéptido recetor conforme descrito, por exemplo, no Pedido de Patente EP nº 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746-1750 (1993); e Plowman *et al.*, *Nature*, 366: 473-475 (1993), incluindo suas isoformas, por exemplo, conforme descrito no documento WO 99/19488, publicada em 22 de Abril de 1999.

"Ligando de HER" indica um polipéptido que se liga a um recetor de HER e/ou o ativa. O ligando de HER de interesse específico no presente documento é ligando HER humano de sequência nativa tal como fator de crescimento epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247: 7612-

7621 (1972)); fator alfa de crescimento de transformação (TGF- α) (Marquardt et al., *Science* 223: 1079-1082 (1984)); anfirregulina, também conhecida como schwanoma ou fator de crescimento de autócrinos queratinócitos (Shoyab et al., *Science* 243: 1074- 1076 (1989); Kimura et al., *Nature* 348: 257-260 (1990); e Cook et al., *Mol. Cell. Biol.* 11: 2547-2557 (1991)); betacelulin (Shing et al., *Science* 259: 1604-1607 (1993); e Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico de ligação a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., *Science* 251: 936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270: 7495-7500 (1995); e Komurasaki et al., *Oncogene* 15: 2841-2848 (1997)); herregulina (veja-se a seguir); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., *Nature* 387: 512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9562-9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari et al., *Oncogene* 18: 2681-89 (1999)) ou cripto (CR-1) (Kannan et al., *J. Biol. Chem.* 272 (6): 3330-3335 (1997)). Ligandos de HER que unem EGFR incluem EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, HB-EGF e epirregulina. Ligandos de HER que se ligam a HER3 incluem herregulinas. Ligandos de HER capazes de unir HER4 incluem betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 e herregulinas.

"Herregulina" (HRG), quando utilizada no presente documento, designa polipéptido codificado pelo produto genético de herregulina conforme descrito na Patente US n° 5.641.869 ou Marchionni et al., *Nature*, 362: 312-318 (1993). Exemplos de herregulinas incluem herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 e herregulina- β 3 (Holmes et al., *Science*, 256: 1205-1210 (1992); e Patente US n° 5.641.869); fator de diferenciação neu (NDF) (Peles et al., *Cell* 69: 205-216 (1992)); atividade indutora de recetor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al., *Cell* 72: 801-815 (1993)); fatores de crescimento glial (GGFs) (Marchionni et al., *Nature*, 362: 312-318 (1993)); fator derivado de

neurónios motores e sensoriais (SMDF) (Ho et al., *J. Biol. Chem.* 270: 14523- 14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer et al., *Oncogene*, 15: 1385-1394). O termo inclui fragmentos biologicamente ativos e/ou variantes de sequência de aminoácidos de polipéptido HRG de sequência nativa, tais como seu fragmento de domínio similar a EGF (tal como HRG β ₁₇₇₋₂₄₄).

Um "dímero de HER" no presente documento é um dímero associado de forma não covalente que compreende pelo menos dois recetores de HER diferentes. Estes complexos podem formar-se quando uma célula que expressa dois ou mais recetores de HER é exposta a ligando de HER e pode ser isolada por imunoprecipitação e analisada por meio de SDS-PAGE conforme descrito, por exemplo, em Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994). Exemplos desses dímeros de HER incluem heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 e HER3-HER4. Além disso, o dímero HER pode compreender dois ou mais recetores de HER2 combinados com recetor de HER diferente, tais como HER3, HER4 ou EGFR. Outras proteínas, tais como subunidade recetora de citoquinas (como gp130), podem ser associadas ao dímero.

"Local de ligação heterodimérica" sobre HER2 designa região no domínio extracelular de HER2 que entra em contato ou forma interface com região no domínio extracelular de EGFR, HER3 ou HER4 mediante a formação de dímero com ele. A região é encontrada no Domínio II de HER2. Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004).

"Ativação de HER" ou "ativação de HER2" designa a ativação, ou fosforilação, de qualquer um ou mais recetores de HER ou recetores de HER2. Geralmente, a ativação de HER resulta em transdução de sinais (tal como a causada por domínio de quinase intracelular de resíduos de tirosina fosforilantes recetores de HER no recetor de HER ou substrato de polipéptido). A ativação de HER pode ser mediada pela ligação a ligandos HER a um dímero de HER que

compreende o recetor de HER de interesse. A ligação a ligando de HER a dímero de HER pode ativar domínio de quinase de um ou mais dos recetores de HER no dímero e, desta forma, resulta em fosforilação de resíduos de tirosina num ou mais dos recetores de HER e/ou fosforilação de resíduos de tirosina em polipéptido(s) substrato(s) adicional(is), tal(is) como quinases intracelulares de Akt ou MAPK.

O termo "anticorpo" é utilizado no presente documento no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (tais como anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intatos e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada.

O termo "anticorpo monoclonal", da forma utilizada no presente documento, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam-se ao mesmo epítipo, exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais como as variantes descritas no presente documento. Ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido a um único determinante sobre o antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por não serem descontaminados por outras imunoglobulinas. O adjetivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como exigindo a produção do anticorpo por meio de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser

preparados, por exemplo, por meio do método de hibridoma descrito em primeiro lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser fabricados por meio de métodos de ADN recombinante (veja-se, por exemplo, a Patente US nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as 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 do presente incluem especificamente anticorpos "quiméricos", nos quais uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes de anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente US nº 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente documento incluem anticorpos "primatizados", que compreendem sequências de ligação a antigénios de domínio variável derivadas de primatas não humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, Chimpanzé, etc.) e sequências de regiões constantes humanas.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma parte de anticorpo intato, que compreende preferentemente a sua região variável ou de ligação a antigénios. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv, diacorpos, anticorpos lineares, moléculas de anticorpos de cadeia simples e anticorpos multiespecíficos formados com fragmento(s) de anticorpos.

"Anticorpo intato" é aquele que compreende uma região

variável de ligação a antígenos, bem como um domínio constante de cadeia leve (C_L) e domínios constantes de cadeia pesada C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (tais como domínios constantes de sequência nativa humanos) ou suas variantes de sequência de aminoácidos. Preferentemente, o anticorpo intato possui uma ou mais funções efetoras e compreende estrutura de oligossacárido ligada a uma ou duas cadeias pesadas do mesmo.

"Funções efetoras" de anticorpos designam as atividades biológicas que podem ser atribuídas à região Fc (região Fc de sequência nativa ou região Fc com variação de sequência de aminoácidos) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpos incluem ligação a Clq, citotoxicidade dependente de complemento, ligação a recetor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação para baixo de recetores da superfície celular (tais como recetor de células B; BCR) etc.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, anticorpos intatos podem ser atribuídos a "classes" diferentes. Existem cinco classes principais de anticorpos intatos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), tais como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às classes diferentes de anticorpos são denominados α , δ , ϵ , γ e μ , respetivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

"Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos" e "ADCC" designam reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam recetores de Fc (FcRs) (tais como Células Matadoras

Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo unido sobre célula alvo e causam em seguida a lise da célula alvo. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida no Quadro 3, pág. 464, de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para determinar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode-se realizar teste de ADCC *in vitro*, tal como descrito na Patente US nº 5.500.362 ou 5.821.337. Células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) e células Matadoras Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, tal como num modelo animal como o descrito em Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam uma ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferentemente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), células matadoras naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; em que PBMCs e células NK são preferidas. As células efetoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa, tal como sangue ou PMBCs, conforme descrito no presente documento.

Os termos "recetor de Fc" ou "FcR" são utilizados para descrever um recetor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é FcR humano de sequência nativa. Além disso, FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo de IgG (recetor gama) e inclui recetores das subclasses de FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses recetores. Os recetores de FcγRII incluem FcγRIIA ("recetor de ativação") e FcγRIIB ("recetor de inibição"), que

possuem sequências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O recetor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação com base em tirosina imunorrecetora (ITAM) em seu domínio citoplasmático. O recetor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição com base em tirosina imunorrecetora (ITIM) no seu domínio citoplasmático (veja-se artigo de crítica M. em Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcRs são analisadas em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457- 92 (1991); Capei et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outras FcRs, incluindo aquelas a serem identificadas no futuro, são englobadas pelo termo "FcR" no presente documento. O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" designa a capacidade de uma molécula de lisar um alvo na presença de complemento. O processo de ativação de complementos é iniciado pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (tal como anticorpo) em complexo com antígeno cognato. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado teste de CDC, conforme descrito, por exemplo, em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

"Anticorpos nativos" são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por ligação a dissulfeto covalente, enquanto a quantidade de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e pesada também contém pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia pesada

contém, numa extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por uma série de domínios constantes. Cada cadeia leve contém um domínio variável numa extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade. O domínio constante da cadeia leve é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve é alinhado ao domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

O termo "variável" indica o fato de que certas partes dos domínios variáveis diferem extensamente de sequência entre os anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para o seu antígeno específico. A capacidade de variação não é, entretanto, distribuída regularmente ao longo de todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis de cadeia leve quanto de cadeia pesada. As partes mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, adotando em grande parte configuração de folha p, ligadas por três regiões hipervariáveis, que formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha p. As regiões hipervariáveis de cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação a antígenos de anticorpos (veja-se Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação a um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efectoras, tais como a participação

do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

O termo "região hipervariável", quando utilizada no presente documento, designa os resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação a antígenos. A região hipervariável compreende geralmente resíduos de aminoácidos de uma "região de determinação de complementaridade" ou "CDR" (isto é, resíduos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)) e/ou os resíduos de um "circuito hipervariável" (isto é, os resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Resíduos de "região de estrutura" ou "FR" são os resíduos de domínios variáveis diferentes dos resíduos de região hipervariável conforme definido no presente documento.

A digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de ligação a antígenos idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada qual com um único local de ligação a antígenos, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade de rápida cristalização. O tratamento com pepsina gera um fragmento de $F(ab')_2$ que contém dois locais de ligação a antígenos e ainda é capaz de reticular antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e de ligação a antígenos completo. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação firme e não covalente. É nesta configuração que as três regiões

hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação a antígenos sobre a superfície do dímero V_H-V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação a antígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou a metade de um Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e unir antígeno, embora em afinidade mais baixa que todo o local de ligação.

O fragmento de Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos de Fab' diferem de fragmentos de Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 de cadeia pesada, que inclui uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a denominação do presente para Fab', em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém(êm) pelo menos um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpos F(ab')₂ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos de Fab' que contêm cisteínas de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

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

Fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia simples" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo, em que esses domínios estão presentes numa única cadeia de polipéptidos. Preferentemente, o polipéptido Fv compreende adicionalmente um ligando de polipéptido entre os domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação a antígenos. Para a análise de scFv, veja-se

Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994). Fragmentos de scFv de anticorpo HER2 são descritos no documento WO 93/16185; Patente US nº 5.571.894; e Patente US nº 5.587.458.

O termo "diacorpos" designa pequenos fragmentos de anticorpos com dois locais de ligação a antígenos, que compreendem um domínio pesado variável (V_H) ligado a um domínio leve variável (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo ($V_H - V_L$). Utilizando um ligando que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar-se com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação a antígenos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, documento EP 404.097, documento WO 93/11161 e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, de roedores) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recetor), nas quais os resíduos de uma região hipervariável do paciente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato, coelho ou primata não humano que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recetor ou no anticorpo dador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis,

em que todos ou substancialmente todos os circuitos hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para pormenores adicionais, veja-se Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Os anticorpos HER2 humanizados incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 ou Trastuzumab (HERCEPTIN®), conforme descrito no Quadro 3 da Patente US nº 5.821.337; anticorpos 520C9 humanizados (documento WO 93/21319) e 2C4 humanizados, conforme descrito no presente documento.

Para os propósitos do presente documento, "Trastuzumab", "HERCEPTIN®" e "huMAb4D5-8" designam um anticorpo que compreende as sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada das SEQ ID N° 13 e 14, respetivamente.

No presente documento, "Pertuzumab", "OMNITARG™" e "rhuMAb 2C4" designam um anticorpo que compreende as sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada variáveis das SEQ ID N° 3 e 4, respetivamente. Quando Pertuzumab for anticorpo intato, ele compreende preferentemente a sequência de aminoácidos de cadeia leve e cadeia pesada nas SEQ ID N° 15 e 16, respetivamente.

Um "anticorpo nu" é um anticorpo (conforme definido no presente documento) que não é conjugado a molécula heteróloga, tal como porção citotóxica ou radiomarcador.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado, separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas para o anticorpo

e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteáceos ou não proteáceos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95 % em peso de anticorpo, conforme determinado por meio do método de Lowry, e, de maior preferência, mais de 99 % em peso; (2) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando um sequenciador de xícara de centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferentemente, manchas de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

Um anticorpo HER2 que "inibe a dimerização de HER mais eficientemente que Trastuzumab" é aquele que reduz ou elimina dímeros de HER mais eficientemente (tal como pelo menos cerca de duas vezes mais eficientemente) que Trastuzumab. Preferentemente, esse anticorpo inibe a dimerização de HER2 de forma pelo menos aproximadamente tão eficiente quanto anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo monoclonal murino 2C4 intato, fragmento de Fab de anticorpo monoclonal murino 2C4, Pertuzumab intato e fragmento de Fab de Pertuzumab. Pode-se avaliar a inibição da dimerização de HER estudando dímeros de HER diretamente, ou avaliando a ativação de HER, ou sinalização abaixo no fluxo, que resulta da dimerização de HER e/ou por meio de avaliação do local de ligação a HER2-anticorpo etc. Testes de seleção de anticorpos com a capacidade de inibir a dimerização de HER mais eficientemente que Trastuzumab são descritos em Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) e documento WO 01/00245 (Adams *et al.*). Unicamente como forma de exemplo, pode-se

testar a inibição da dimerização de HER determinando-se, por exemplo, a inibição da formação de dímeros de HER (veja-se, por exemplo, a Fig. 1A-B de Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); e documento WO 01/00245); redução da ativação por ligando HER de células que expressam dímeros de HER (documento WO 01/00245 e Fig. 2A-B de Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo); bloqueio da ligação a ligando HER a células que expressam dímeros de HER (documento WO 01/00245 e Fig. 2E de Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo); inibição do crescimento celular de células cancerosas (tais como células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expressam dímeros de HER na presença (ou ausência) de ligando de HER (documento WO 01/00245 e Figs. 3A-D de Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-37 (2002), por exemplo); inibição da sinalização a jusante no fluxo (tal como inibição da fosforilação de AKT dependente de HRG ou inibição da fosforilação de MAPK dependente de HRG ou TGF α) (veja-se documento WO 01/00245 e Fig. 2C-D de Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo). Pode-se também determinar se o anticorpo inibe a dimerização de HER por meio de estudo do local de ligação a anticorpo e HER2, tal como por meio de avaliação de estrutura ou modelo, como estrutura de cristal, do anticorpo unido a HER2 (veja-se, por exemplo, Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)).

O anticorpo HER2 pode "inibir a fosforilação de AKT dependente de HRG" e/ou inibir "fosforilação de MARK dependente de HRG ou TGF α " mais eficientemente (tal como pelo menos duas vezes mais eficientemente) que Trastuzumab (veja-se Agus et al., *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) e documento WO 01/00245, por exemplo).

O anticorpo HER2 pode ser aquele que "não inibe a divisão de ectodomínio de HER2" (Molina et al., *Cancer Res.* 61: 4744-4749 (2001)).

Um anticorpo HER2 que "se liga ao local de ligação heterodimérico" de HER2 liga-se a resíduos no domínio II (e, opcionalmente, também se liga a resíduos em outro dos domínios do domínio extracelular de HER2, tais como domínios I e III) e pode obstruir estericamente, pelo menos até certo ponto, a formação de heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3 ou HER2-HER4. Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004), caracterizam a estrutura de cristal de HER2-Pertuzumab, depositada no Banco de Dados de Proteínas RCSB (Código ID IS78), que ilustra exemplo de anticorpo que se liga ao local de ligação heterodimérico de HER2.

Um anticorpo que "se liga ao domínio II" de HER2 liga-se a resíduos no domínio II e, opcionalmente, resíduos em outro(s) domínio(s) de HER2, tal(is) como domínios I e III. Preferentemente, o anticorpo que se liga a domínio II liga-se à junção entre os domínios I, II e III de HER2.

Um "agente inibidor de crescimento", da forma utilizada no presente documento, designa um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente célula cancerosa que expressa HER, seja *in vitro* ou *in vivo*. Desta forma, o agente inibidor do crescimento é aquele que reduz significativamente o percentual de células que expressam HER em fase S. Exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam o progresso do ciclo celular (em local diferente da fase S), tais como agentes que induzem a paragem de G1 e a paragem da fase M. Os bloqueadores clássicos da fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores topo II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida e bleomicina. Os agentes que param G1 também invadem a paragem da fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN, tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e

Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13.

Exemplos de anticorpos "inibidores do crescimento" são aqueles que se ligam a HER2 e inibem o crescimento de células cancerosas que sobreexpressam HER2. Os anticorpos HER2 inibidores do crescimento preferidos inibem o crescimento de células de tumor de mama SK-BR-3 em cultura celular em mais de 20 % e, preferentemente, mais de 50 % (tal como cerca de 50 % a cerca de 100 %) em concentração de anticorpos de cerca de 0,5 a 30 µg/ml, em que a inibição do crescimento é determinada seis dias após a exposição das células SK-BR-3 ao anticorpo (veja-se a Patente US nº 5.677.171 emitida em 14 de Outubro de 1997). O teste de inibição do crescimento de células SK-BR-3 é descrito em mais pormenores naquela patente e abaixo no presente documento. O anticorpo inibidor do crescimento preferido é variante humanizada de anticorpo monoclonal murino 4D5, tal como Trastuzumab.

Um anticorpo que "induz a apoptose" é aquele que induz a morte celular programada, conforme determinado por meio da ligação a anexina V, fragmentação de ADN, contração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de bolhas de membrana (denominadas corpos apoptóticos). A célula é normalmente aquela que sobreexpressa o recetor de HER2. Preferentemente, a célula é célula tumoral, tal como célula da mama, ovário, estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireoide, pancreática ou da bexiga. *In vitro*, a célula pode ser célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou SKOV3. Diversos métodos são disponíveis para a avaliação dos eventos celulares associados à apoptose. A translocação de fosfatidil serina (PS), por exemplo, pode ser medida pela ligação a anexina; a fragmentação de ADN pode ser

avaliada por meio de escalas de ADN; e condensação nuclear/de cromatina juntamente com fragmentação de ADN pode ser avaliada por meio de qualquer aumento das células hipodiploides. Preferentemente, o anticorpo que induz a apoptose é aquele que resulta em cerca de duas a cinquenta vezes, preferentemente cerca de cinco a cinquenta vezes e, de preferência superior, cerca de dez a cinquenta vezes, a indução da ligação a anexina com relação a células não tratadas em ensaio de ligação a anexina utilizando células BT474 (veja-se a seguir). Exemplos de anticorpos HER2 que induzem a apoptose são 7C2 e 7F3.

O "epítopo 2C4" é a região no domínio extracelular de HER2 à qual se liga o anticorpo 2C4. Para selecionar anticorpos que se liguem ao epítopo 2C4, pode-se realizar teste bloqueador cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Alternativamente, pode-se realizar o mapeamento de epítopos para determinar se o anticorpo liga-se ao epítopo 2C4 de HER2 utilizando métodos conhecidos na técnica e/ou pode-se estudar a estrutura de anticorpo-HER2 (Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)) para observar qual(is) domínio(s) de HER2 é(são) unido(s) pelo anticorpo. O epítopo 2C4 compreende resíduos do domínio II no domínio extracelular de HER2. 2C4 e Pertuzumab ligam-se ao domínio extracelular de HER2 na junção dos domínios I, II e III. Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004).

O "epítopo 4D5" é a região no domínio extracelular de HER2 à qual se ligam o anticorpo 4D5 (ATCC CRL 10463) e Trastuzumab. O epítopo está próximo do domínio transmembrana de HER2 e dentro do Domínio IV de HER2. Para selecionar anticorpos que se liguem ao epítopo 4D5, pode-se realizar um teste bloqueador cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988).

Alternativamente, pode-se realizar o mapeamento de epítomos para determinar se o anticorpo se liga ao epítopo 4D5 de HER2 (tal como qualquer um ou mais resíduos na região de perto do resíduo 529 a cerca do resíduo 625, inclusive; nas Fig. 1).

O "epítopo 7C2/7F3" é a região no terminal N, dentro do Domínio I, do domínio extracelular de HER2 à qual se ligam os anticorpos 7C2 e/ou 7F3 (cada qual depositado com a ATCC, veja-se a seguir). Para selecionar anticorpos que se liguem ao epítopo 7C2/7F3, pode-se realizar um teste bloqueador cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Alternativamente, pode-se realizar mapeamento de epítomos para determinar se o anticorpo se liga ao epítopo 7C2/7F3 de HER2 (tal como qualquer um ou mais resíduos na região de perto do resíduo 22 a cerca do resíduo 53 de HER2 na Fig. 1).

"Tratamento" designa tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Os necessitados de tratamento incluem os que já detêm a doença, bem como aqueles em que a doença deve ser evitada. Desta forma, o paciente a ser tratado no presente documento pode haver sido diagnosticado como portador da doença ou pode ser predisposto ou suscetível à doença.

Os termos "cancro" e "canceroso" designam ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem, mas sem se limitar a carcinoma, linfoma, blastema (incluindo meduloblastoma e retinoblastoma), sarcoma (incluindo lipossarcoma e sarcoma de células sinoviais), tumores neuroendócrinos (incluindo tumores carcinoides, gastrinoma e cancro de células ilha), mesotelioma, schwannoma (incluindo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma e leucemia ou

malignidades linfoides. Exemplos mais específicos desses câncros incluem câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células escamosas epiteliais), câncer do pulmão, incluindo câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão não de células pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou estomacal, incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer da cervical, câncer do ovário, câncer do fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer do cólon, câncer retal, câncer colo-retal, carcinoma uterino ou endométrico, carcinoma das glândulas salivares, câncer renal ou dos rins, câncer da próstata, câncer da vulva, câncer da tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, câncer dos testículos, câncer do esôfago, tumores do trato biliar, bem como câncer da cabeça e do pescoço.

O termo "quantidade eficaz" designa quantidade de fármaco eficaz para o tratamento de câncer no paciente. Quando a doença for câncer, a quantidade eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerosas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, reduzir a velocidade até certo ponto e, preferentemente, suspender) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir (isto é, reduzir até certo ponto e, preferentemente, suspender) a metástase tumoral; inibir, até certo ponto, o crescimento de tumores; e/ou melhorar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associados ao câncer. Desde que possa evitar o crescimento de células cancerosas existentes e/ou matá-las, a fármaco pode ser citostática e/ou citotóxica. A quantidade eficaz pode estender a sobrevivência livre de progresso, resultar em reação objetiva (incluindo reação parcial, PR, ou reação completa, CR), aumentar o tempo de sobrevivência geral e/ou melhorar um ou mais sintomas de câncer.

Um "cancro que expressa HER2" é aquele que compreende células que contêm proteína HER2 presente na sua superfície celular.

Um cancro que "sobreexpressa" um recetor de HER é aquele que contém níveis significativamente mais altos de recetor de HER, tal como HER2, na sua superfície celular, em comparação com célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Essa sobreexpressão pode ser causada por amplificação genética ou por maior transcrição ou tradução. A sobreexpressão do recetor de HER pode ser determinada em teste de diagnóstico ou prognóstico, por meio da avaliação de níveis mais altos da proteína HER presentes sobre a superfície de uma célula (por exemplo, por meio de teste de imunohistoquímica; IHC). Alternativa, ou adicionalmente, pode-se medir os níveis de ácido nucleico codificador de HER na célula, por exemplo, por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH; veja-se documento WO 98/45479 publicada em Outubro de 1998), Southern Blot ou técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), tais como PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Pode-se também estudar a sobreexpressão do recetor de HER por meio da medição de antígeno dividido (por exemplo, domínio extracelular de HER) em fluido biológico tal como soro (veja-se, por exemplo, a Patente US nº 4.933.294 emitida em 12 de Junho de 1990; documento WO 91/05264 publicada em 18 de Abril de 1991; Patente US nº 5.401.638 emitida em 28 de março de 1995; e Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Além dos testes acima, diversos outros testes *in vivo* são disponíveis para os peritos na especialidade. Pode-se, por exemplo, expor as células no corpo do paciente a um anticorpo que seja opcionalmente marcado com marca detetável, tal como isótopo radioativo, e pode-se avaliar a ligação do anticorpo a células do paciente, por exemplo, por meio de varrimento externo para avaliação da radioatividade ou de análise de biópsia retirada de

paciente exposto anteriormente ao anticorpo.

Por outro lado, um cancro que "não sobreexpressa recetor de HER2" é aquele que não expressa níveis significativamente acima dos níveis normais de recetor de HER2 em comparação com uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido.

Um cancro que "sobreexpressa" um ligando de HER é aquele que produz níveis significativamente mais altos daquele ligando em comparação com célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Essa sobreexpressão pode ser causada por amplificação genética ou por maior transcrição ou tradução. A sobreexpressão do ligando de HER pode ser determinada por meio de diagnóstico por avaliação de níveis do ligando (ou do ácido nucleico que o codifica) no paciente, por exemplo, em biópsia de tumores ou por meio de vários testes de diagnóstico, tais como IHC, FISH, Southern Blot, PCR ou ensaios *in vivo* descritos acima.

O termo "agente citotóxico", da forma utilizada no presente documento, indica uma substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou causa destruição das células. A expressão destina-se a incluir isótopos radioativos (tais como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos e toxinas tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo seus fragmentos e/ou variantes.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida,

trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); delta-9- tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; camptotecin (incluindo o análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecin, escopolectin e 9-aminocamptotecin); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesin, carzelesin e bizelesin); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicin (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucil, clornazafina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 11 e caliqueamicina ômega 11 (veja-se, por exemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A; esperamicina; bem como neocarzinostatina cromóforo e cromóforos antibióticos de enedina cromoproteína relacionados), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluindo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, injeção de lipossoma doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina lipossômica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina lipossômica pegilada (CAELYX®) e

desoxidoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcelomicin, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamycin, olivomicinas, peplomicin, potfiromycin, puromycin, quelamicin, rodorubicin, estreptonigrin, estreptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; antimetabólitos, tais como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), epotilona e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamido glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitaerina; pentostatin; fenamet; pirarubicin; losoxantrona; 2-etil hidrazida; procarbazona; complexo de polissacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2', 2''-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A e anguidina); uretano; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por exemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulação de nanopartículas elaborada com albumina de paclitaxel (ABRAXANE™) e docetaxel (TAXOTERE®); clorambucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platina

tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vincas, que evitam que a polimerização de tubulina forme microtúbulos, incluindo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) e vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovin; novantrona; edatrexato; daunomicin; aminopterina; ibandronato; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tais como ácido retinoico, incluindo bexarotene (TARGRETIN®); bifosfonatos, tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) ou risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (análogo de 1,3-dioxolano nucleosídeo citosina); oligonucleótidos sem sentido, particularmente os que inibem a expressão de genes em processos de sinalização implicados em proliferação celular aberrante, tais como PKC-alfa, Raf, H-Ras e recetor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas tais como vacina THERATOPE® e vacinas de terapêutica genética, tais como vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; inibidor da topoisomerase 1 (tal como LURTOTECAN®); rmRH (tal como ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inibidor de COX-2 (tal como celecoxib ou etoricoxib), inibidor de proteossomos (tal como PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódio (GENASENSE®); pixantrona; inibidores de EGFR (veja-se definição a seguir); inibidores de tirosina quinase (veja-se definição a seguir); e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima, tais como CHOP, abreviação de terapêutica combinada de ciclofosfamida, doxorubicin, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, abreviação de regime de tratamento com oxaliplatin

(ELOXATIN™) combinada com 5-FU e leucovovin.

Também são incluídos nesta definição agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação hormonal sobre tumores tais como antiestrogénios com perfil agonista/antagonista misturado, incluindo tamoxifen (NOVALDEX®), 4-hydroxytamoxifen, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, queoxifeno e moduladores recetores de estrogénios seletivos (SERMs), tais como SERM3; antiestrogénios puros sem propriedades agonistas, tais como fulvestrante (FASLODEX®) e EM800 (esses agentes podem bloquear a dimerização de recetores de estrogénios (ER), inibir a ligação a ADN, aumentar o rendimento de ER e/ou suprimir os níveis de ER); inibidores da aromatase, incluindo inibidores da aromatase esteroidais, tais como formestano e exemestano (AROMASIN®), e inibidores da aromatase não esteroidais, tais como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) e aminoglutetimida, e outros inibidores da aromatase que incluem vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de hormonas que liberam hormonas luteinizantes, incluindo leuprolida (LUPRON® e ELIGARD®), goserelin, buserelin e tripterelin; esteroides sexuais, incluindo progestinas tais como acetato de megestrol e acetato de medroxiprogesterona, estrogénios tais como dietilestilbestrol e premarin e androgénios/retinoides tais como fluoximesterona, todo ácido transretiónico e feretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores para baixo de recetores estrogénios (ERDs); antiandrogénios tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; testolactona; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima.

Da forma utilizada no presente documento, a expressão "fármaco dirigido a EGFR" indica um agente terapêutico que se liga a EGFR e, opcionalmente, inibe a ativação de EGFR.

Exemplos desses agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que se ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos que se ligam a EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (veja-se Patente US nº 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) e suas variantes, tais como 225 quimerizado (C225 ou Cetuximab; ERBUTIX®) e 225 humano remodelado (H225) (veja-se documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, anticorpo dirigido a EGFR totalmente humano (Imclone); anticorpos que unem EGFR mutante do tipo II (Patente US nº 5.212.290); anticorpos quiméricos e humanizados que unem EGFR conforme descrito na Patente US nº 5.891.996; e anticorpos humanos que unem EGFR, tais como ABX-EGF ou Panitumumab (veja-se documento WO 98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.*, *Eur. J. Cancer* 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), anticorpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compete com EGF e TGF-alfa pela ligação a EGFR (EMD/Merck); anticorpo EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticorpos totalmente humanos conhecidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 e E7.6.3 e descritos em US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc.); e mAb 806 ou mAb 806 humanizado (Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279 (29): 30375-30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente citotóxico, de forma a gerar um imunoconjugado (veja-se, por exemplo, documento EP 659.439 A2, Merck Patent GmbH). Os antagonistas de EGFR incluem moléculas pequenas tais como os compostos descritos nas Patentes US nº 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 e 5.747.498, bem como as publicações PCT a seguir: documento WO 98/14451, documento WO 98/50038, documento WO 99/09016 e WO99/24037. Antagonistas de EGFR de moléculas pequenas específicos incluem OSI-774 (CP-358774,

erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (C1 1033, 2-propenamida, dicloridrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA™) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidino-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Sugen); AG1571 (SU 5271; Sugem); inibidores de tirosina quinase EGFR/HER2 duplos, tais como lapatinib (GW 572016 ou N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]6[5[[[2metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; Glaxo-SmithKline) ou cianoguanidina quinazolina e derivados de cianoguanidina quinazolina.

"Inibidor da tirosina quinase" é molécula que inibe, até certo ponto, a atividade de tirosina quinase de tirosina quinase tal como recetor de HER. Exemplos desses inibidores incluem os fármacos dirigidos a EGFR observadas no parágrafo anterior; inibidor de tirosina quinase de HER2 de moléculas pequenas, tal como TAK165 disponível por meio da Takeda; CP- 724.714, inibidor seletivo oral da tirosina quinase recetora de ErbB2 (Pfizer e OSI); inibidores de HER duplos tais como EKB-569 (disponível por meio da Wyeth) que liga preferentemente EGFR mas inibe células que sobreexpressam HER2 e EGFR; lapatinib (GW572016; disponível por meio da Glaxo-SmithKline, inibidor de tirosina quinase

HER2 e EGFR oral; PKI-166 (disponível por meio da Novartis); inibidores pan-HER tais como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inibidores de Raf-1 tais como agente sem sentido ISIS-5132 disponível por meio da ISIS Pharmaceuticals, que inibe a sinalização de Raf-1; inibidores de TK não dirigidos por HER tais como mesilato de Imatinib (GLEEVAC®) disponível por meio da Glaxo; inibidor de quinase I regulado extracelular MAPK CI-1040 (disponível por meio da Pharmacia); quinazolininas, tais como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contêm porções nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas sem sentido (tais como as que se ligam a ácido nucleico codificador de HER); quinoxalinas (Patente US nº 5.804.396); trifostinas (Patente US nº 5.804.396); D6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inibidores pan-HER, tais como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); cianoguanidina quinazolina e derivados de cianoamidino quinazolamina; ou conforme descrito em qualquer das publicações de patentes a seguir: Patente US nº 5.804.396; documento WO 99/09016 (American Cyanamid); documento WO 98/43960 (American Cyanamid); documento WO 97/38983 (Warner Lambert); documento WO 99/06378 (Warner Lambert); documento WO 99/06396 (Warner Lambert); documento WO 96/30347 (Pfizer, Inc); documento WO 96/33978 (Zeneca); documento WO 96/3397 (Zeneca); documento WO 96/33980 (Zeneca); e documento US2005/0101617.

Um "agente anti-angiogénico" designa um composto que bloqueia ou interfere, até certo grau, no desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator anti-angiogénico pode ser, por exemplo, uma molécula pequena ou anticorpo que se liga a fator de crescimento ou recetor de fator de crescimento envolvido na promoção da angiogénese. O fator anti-angiogénico preferido do presente é um anticorpo que se liga ao Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), tal como Bevacizumab (AVASTIN®).

O termo "citoquina" é termo genérico para proteínas libertadas por uma população celular que agem sobre outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos dessas citoquinas são linfoquinas, monoquinas e hormonas de polipéptidos tradicionais. Encontram-se incluídos entre as citoquinas hormonas do crescimento, tais como hormona do crescimento humano, hormona do crescimento humano N-metionilo e hormona do crescimento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pró-relaxina; hormonas de glicoproteínas tais como hormona estimulante dos folículos (FSH), hormona estimulante da tireoide (TSH) e hormona luteinizante (LH); fator do crescimento hepático; fator de crescimento dos fibroblastos; prolactina; lactogénio da placenta; fator de necrose tumoral α e β ; substância inibidora mulleriana; péptido associado a gonadotropina de ratinhos; inibina; activina; fator de crescimento endoteliano vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento dos nervos tais como NGF- β ; fator de crescimento das plaquetas, fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento similar à insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões, tais como interferão- α , β e γ ; fatores estimulantes de colónias (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1a, IL-2,

IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; fator de necrose tumoral tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores de polipéptidos que incluem LIF e ligando kit (KL). Da forma utilizada no presente documento, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

II. Composições Variantes de Anticorpo HER2

A presente invenção refere-se à composição de anticorpo HER2 como definido nas reivindicações.

A presença da extensão líder amino-terminal na composição pode ser detetada por meio de vários métodos analíticos que incluem, mas sem se limitar a análise de sequências N-terminais, teste de heterogeneidade de carga (tal como cromatografia de permuta de catiões ou eletroforese da zona capilar), espectrometria de massa etc. A quantidade da variante de anticorpo na composição geralmente varia de quantidade que constitui o limite de detecção inferior de qualquer teste (preferentemente análise de permuta de catiões) utilizado para detetar a variante em quantidade menor que a quantidade do anticorpo de espécie principal.

De 5 % a cerca de 15 %, preferentemente cerca de 8 % a cerca de 12 %) das moléculas de anticorpos na composição compreendem extensão líder amino-terminal. Esses valores percentuais são preferentemente determinados utilizando análise de permuta de catiões.

Além da variante de extensão líder amino-terminal, alterações de sequências de aminoácidos adicionais do anticorpo de espécie principal e/ou variante são contempladas, incluindo mas sem se limitar a anticorpo que compreende resíduo de lisina C-terminal sobre uma ou as suas duas cadeias pesadas (essa variante de anticorpo pode

estar presente em quantidade de cerca de 1 % a cerca de 20 %), variante de anticorpo desamidada (tal como em que Asn-386 e/ou Asn-391 sobre uma ou duas cadeias pesadas de Pertuzumab são desamidadas), anticorpo com um ou mais resíduos de metionina oxidados (tal como Pertuzumab que compreende met-254 oxidado) etc.

Além disso, o anticorpo de espécie principal pode compreender ainda variações de glicosilação, cujos exemplos não limitadores incluem anticorpo que compreende estrutura de oligossacárido G1 ou G2 ligada à sua região Fc, anticorpo que compreende fração de hidrato de carbono ligada a uma de suas cadeias leves (tal como uma ou duas frações de hidrato de carbono, tais como glicose ou galactose, ligadas a uma ou duas cadeias leves do anticorpo, tais como ligadas a um ou mais resíduos de lisina), anticorpo que compreende uma ou duas cadeias pesadas não glicosiladas ou anticorpo que compreende oligossacárido sialilado ligado a uma ou duas cadeias pesadas do mesmo etc.

Além disso, a presente invenção proporciona anticorpo que compreende uma ou duas cadeias leves, em que uma ou as duas cadeias leves compreendem a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 23. Este anticorpo compreende ainda uma ou duas cadeias pesadas, em que uma ou as duas cadeias pesadas compreendem a sequência de aminoácidos na SEQ ID N° 16 ou na SEQ ID N° 24 (ou suas variantes desamidadas e/ou oxidadas).

A composição pode ser recuperada a partir de linha celular elaborada geneticamente, tal como linha de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) que expressam o anticorpo HER2, ou pode ser preparada por meio de síntese de péptidos.

III. Produção de Anticorpos HER2

Segue-se uma descrição de exemplos de técnicas de produção dos anticorpos utilizados de acordo com a presente invenção. O antigénio HER2 a ser utilizado para a produção de anticorpos pode ser, por exemplo, forma solúvel do domínio extracelular de HER2 ou uma de suas partes que contém o epítipo desejado. Alternativamente, células que expressam HER2 na sua superfície celular (por exemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpressar HER2; ou linha de células de carcinoma tais como células SK-BR-3, veja-se Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991)), podem ser utilizadas para gerar anticorpos. Outras formas de HER2 úteis para a geração de anticorpos serão evidentes para os peritos na especialidade.

(i) Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são preferentemente elevados em animais por meio de injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio relevante a uma proteína que seja imunogénica na espécie a ser imunizada tal como hemocianina de conchas, albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando agente bifuncional ou derivatizante, tal como éster maleimidobenzóil sufossuccinimida (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (por meio de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 são grupos alquilo diferentes.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos ou derivados por meio de combinação, por exemplo, de 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com

três volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução de forma intradérmica em diversos locais. Um mês mais tarde, os animais são incentivados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante completo de Freund, por meio de injeção subcutânea em diversos locais. Sete a 14 dias mais tarde, os animais são sangrados e o soro é testado para determinar a titulação de anticorpos. Os animais são incentivados até a estabilização do título. Preferentemente, o animal é incentivado com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou por meio de reagente de retícula diferente. Os conjugados podem também ser elaborados em cultura celular recombinante, na forma de fusões de proteínas. Além disso, agentes agregantes tais como alúmen são adequadamente utilizados para aumentar a reação imunológica.

(ii) Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam-se ao mesmo epítopo, exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais como as variantes descritas no presente documento. Desta forma, o adjetivo "monoclonal" indica a característica do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos, por exemplo, utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser fabricados por meio de métodos de ADN recombinante (Patente US nº 4.816.567).

No método de hibridoma, ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster, é imunizado na

forma descrita acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fusionados em seguida a células de mieloma, utilizando agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar urna célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultura apropriado que contém preferentemente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fusionadas. Caso as células de mieloma parentais não contenham a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), por exemplo, o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

As células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, apoiam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a meio tal como meio HAT. Dentre estas, as linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de ratinhos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis por meio da Coleção Americana de Culturas Celulares, Rockville, Maryland, EUA. Linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma humano de ratinhos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,

págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão crescendo é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. Preferentemente, a especificidade de ligação a anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou de ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, por meio da análise Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados por meio da limitação de procedimentos de diluição e cultivados por meio de métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura apropriados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em animal.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por meio de procedimentos convencionais de purificação de anticorpos, tais como proteína A Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

ADN que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando-se procedimentos convencionais (empregando, por exemplo, sondas de oligonucleótidos que são capazes de ligar-se especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem de fonte preferida desse ADN. Uma vez isolado, o ADN

pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células de COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de análise sobre a expressão recombinante em bactérias de ADN que codificam o anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

Numa forma de realização adicional, anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552- 554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respetivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (intervalo de nM) por meio de mistura de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), bem como infeções combinatórias e recombinação *in vivo*, como estratégia para a construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Desta forma, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O ADN pode também ser modificado, por exemplo, por meio de substituição da sequência de codificação por domínios constantes de cadeia leve e cadeia pesada humana no lugar das sequências murinas homólogas (Patente US nº 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), ou por meio de ligação covalente da

sequência de codificação de imunoglobulina com a sequência de codificação para um polipéptido não de imunoglobulina, no todo ou em parte.

Tipicamente, esses polipéptidos não de imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo ou são substituídos pelos domínios variáveis de um local de combinação de antígenos de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de combinação de antígenos que possui especificidade para um antígeno e outro local de combinação de antígenos que possui especificidade para um antígeno diferente.

(iii) Anticorpos humanizados

Métodos de humanização de anticorpos não humanos foram descritos na técnica. Preferentemente, um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente denominados resíduos "importados", que são tomados tipicamente de domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), por meio de substituição de sequências de regiões hipervariáveis pelas sequências correspondentes de anticorpo humano. Consequentemente, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US nº 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intato foi substituído pela sequência correspondente de espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de regiões hipervariáveis e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em

anticorpos de roedores.

A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados no fabrico dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor adequação", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que é a mais próxima da do roedor é aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Outro método utiliza uma região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com método preferido, anticorpos humanizados são preparados por meio de processo de análise das sequências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das sequências parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os peritos na especialidade. São disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de possíveis sequências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção destas exposições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da possível sequência de imunoglobulina, ou seja, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da

possível imunoglobulina de unir o seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências recetora e importada para atingir a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo. Geralmente, os resíduos da região hipervariável estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação a antígenos.

O documento WO 01/00245 descreve a produção de exemplos de anticorpos HER2 humanizados que se ligam a HER2 e bloqueiam a ativação de ligandos de recetor de HER. O anticorpo humanizado de interesse específico no presente documento bloqueia a ativação mediada por EGF, TGF- α e/ou HRG de MAPK de forma essencialmente tão eficiente quanto anticorpo monoclonal murino 2C4 intato (ou seu fragmento de Fab) e/ou liga-se a HER2 de forma essencialmente tão eficiente quanto anticorpo monoclonal murino 2C4 intato (ou seu fragmento de Fab). O anticorpo humanizado do presente documento pode compreender, por exemplo, resíduos de regiões hipervariáveis não humanas incorporados a um domínio pesado variável humano e pode compreender adicionalmente uma substituição de região de estrutura (FR) em posição selecionada a partir do grupo que consiste em 69H, 71H e 73H, utilizando o sistema de numeração de domínios variáveis estabelecido em Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991). Numa forma de realização, o anticorpo humanizado compreende substituições FR em duas ou todas as posições 69H, 71H e 73H.

Um exemplo de anticorpo humanizado de interesse no presente documento compreende os resíduos de determinação de complementaridade pesados variáveis GFTFTDYTMX, em que X é preferentemente D ou S (SEQ ID N° 7), DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID N° 8) e/ou NLGPSFYFDY (SEQ ID N° 9), que

compreendem opcionalmente modificações de aminoácidos desses resíduos de CDR, por exemplo, em que as modificações essencialmente mantêm ou aumentam a afinidade do anticorpo. A variante de anticorpo de interesse, por exemplo, pode conter cerca de um a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácidos nas sequências de CDR pesadas variáveis acima. Essas variantes de anticorpos podem ser preparadas por meio de amadurecimento por afinidade, por exemplo, conforme descrito abaixo. O anticorpo humanizado de maior preferência compreende a sequência de aminoácidos pesada variável na SEQ ID N° 4.

O anticorpo humanizado pode compreender resíduos de determinação de complementaridade leves variáveis KASQDV SIGVA (SEQ ID N° 10); SASYX¹X²X³, em que X¹ é preferentemente R ou L, X² é preferentemente Y ou E e X³ é preferentemente T ou S (SEQ ID N° 11); e/ou QQYYIYPYT (SEQ ID N° 12), por exemplo, além dos resíduos de CDR de domínio pesado variável no parágrafo anterior. Esses anticorpos humanizados compreendem opcionalmente modificações de aminoácidos dos resíduos de CDR acima, por exemplo, em que as modificações essencialmente mantêm ou aumentam a afinidade do anticorpo. A variante de anticorpo de interesse, por exemplo, pode conter cerca de um a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácidos nas sequências de CDR leve variável acima. Essas variantes de anticorpos podem ser preparadas por meio de amadurecimento por afinidade, por exemplo, conforme descrito abaixo. O anticorpo humanizado de maior preferência compreende a sequência de aminoácidos leve variável em SEQ ID N° 3.

O presente pedido também contempla anticorpos amadurecidos por afinidade que se ligam a **HER2** e bloqueiam a ativação de ligandos de recetor de HER. O anticorpo parental pode ser anticorpo humano ou anticorpo humanizado, tal como um que compreenda as sequências leve variável e/ou pesada variável das SEQ ID N° 3 e 4, respetivamente (isto

é, variante 574). O anticorpo amadurecido por afinidade preferentemente liga-se ao recetor de HER2 com afinidade superior à de 2C4 murino intato ou variante 574 intata (tal como afinidade cerca de duas ou cerca de quatro vezes a cerca de cem vezes ou cerca de mil vezes maior, tal como conforme determinado utilizando ELISA de domínio extracelular-HER2 (ECD)). Exemplos de resíduos de CDR pesada variáveis para substituição incluem H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 ou combinações de dois ou mais (tais como dois, três, quatro, cinco, seis ou sete desses resíduos). Exemplos de resíduos de CDR leve variáveis para alteração incluem L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 ou combinações de dois ou mais (tais como dois a três, quatro, cinco ou até cerca de dez desses resíduos).

São contempladas várias formas do anticorpo humanizado ou anticorpo amadurecido por afinidade. O anticorpo humanizado ou anticorpo amadurecido por afinidade, por exemplo, pode ser fragmento de anticorpo, tal como Fab, que é opcionalmente conjugado com um ou mais agentes citotóxicos, a fim de gerar imunoconjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado ou anticorpo amadurecido por afinidade pode ser anticorpo intato, tal como anticorpo IgG1 intato.

(iv) Anticorpos humanos

Como alternativa para a humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. É agora possível produzir, por exemplo, animais transgénicos (tais como ratinhos) que são capazes, mediante imunização, de produzir repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a exclusão homozigótica do gene da região de ligação a cadeia pesada de anticorpos (J_H) em ratinhos quiméricos e mutantes de linha germinal resulta na inibição completa da produção

de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linha germinal humana nesses ratinhos com mutação da linha germinal resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio com antígenos. Veja-se, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); e Patentes US nº 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807.

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de exibição de fagos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)) para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de dadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpos são clonados em quadro num gene de proteína de revestimento maior ou menor de bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene codificador do anticorpo que exibe essas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fagos pode ser realizada numa série de formatos; para sua análise, veja-se, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição do fago. Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) isolaram um conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de ratinhos imunizados. Um repertório de genes V de dadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um conjunto diverso de

antigénios (incluindo autoantigénios) podem ser isolados seguindo-se essencialmente as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Veja-se também as Patentes US nº 5.565.332 e 5.573.905.

Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (veja-se as Patentes US nº 5.567.610 e 5.229.275).

Os anticorpos HER2 humanos são descritos na Patente US nº 5.772.997 emitida em 30 de Junho de 1998 e documento WO 97/00271 publicada em 3 de Janeiro de 1997.

(v) *Fragmentos de anticorpos*

Foram desenvolvidas diversas técnicas de produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intatos (veja-se, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados, por exemplo, a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos de F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outros métodos de produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os peritos na especialidade. Em outras formas de realização, o anticorpo selecionado é um fragmento de Fv de cadeia simples (scFv). Veja-se documento WO 93/16185; Patente US nº 5.571.894; e

Patente US nº 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser "anticorpo linear", conforme descrito, por exemplo, na Patente US nº 5.641.870. Esses fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes. Exemplos de anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítomos diferentes da proteína HER2. Outros desses anticorpos podem combinar local de ligação a HER2 com local(is) de ligação para EGFR, HER3 e/ou HER4. Alternativamente, um braço HER2 pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula acionadora sobre leucócito, tal como molécula recetora de células T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou recetores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de forma a dirigir mecanismos de defesa celular para a célula que expressa HER2. Anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expressam HER2. Esses anticorpos possuem um braço de ligação a CD20 e um braço que se liga ao agente citotóxico (tal como saporina, anti- interferão-α, vinca alcaloide, cadeia A rícina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Anticorpos biespecíficos podem ser preparados na forma de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (tais como anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

O documento WO 96/16673 descreve um anticorpo HER2/FcγRIII biespecífico e a Patente US nº 5.837.234 descreve um anticorpo ID11 HER2/FcγRI biespecífico (Osidem). Um anticorpo HER2/Fcα biespecífico é exibido no documento WO 98/02463. A Patente US nº 5.821.337 ensina um

anticorpo HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 é HER2-FcγRIII biespecífico.

Métodos de fabrico de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Devido à seleção aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada por meio de etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de anticorpos e antigénios) são fusionados a sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão ocorre preferentemente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de articulação, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para ligação a cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se for desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são cotransfectados num organismo hospedeiro apropriado. Isso proporciona grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptidos em formas de realização quando razões desiguais das três cadeias de

polipéptidos utilizadas na construção fornecerem os rendimentos ideais. É possível, entretanto, inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipéptidos num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipéptidos em razões iguais resultar em altos rendimentos ou quando as razões não forem de significação específica.

Numa forma de realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com primeira especificidade de ligação num braço e um par de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (que proporciona segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa estrutura assimétrica possibilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica proporciona forma fácil de separação. Esta abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para pormenores adicionais de geração de anticorpos biespecíficos, consulte, por exemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente US nº 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser construída de forma a maximizar o percentual de heterodímeros que é recuperado da cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio Ch3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (tais como tirosina ou triptofano). "Poços" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a interface da segunda molécula de anticorpo, por meio da substituição de grandes cadeias

laterais de aminoácidos com cadeias menores (tais como alanina ou treonina). Isso proporciona mecanismo de aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado, por exemplo, a avidina e o outro a biotina. Esses anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunológico a células indesejadas (Patente US nº 4.676.980) e para o tratamento de infecções por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373 e documento EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados utilizando qualquer método reticulante conveniente. Os agentes reticulantes apropriados são bem conhecidos na técnica e descritos na Patente US nº 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas reticulantes.

As técnicas de geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados, por exemplo, utilizando ligações químicas. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem procedimento em que anticorpos intatos são divididos proteoliticamente para gerar fragmentos de $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente formador de complexo de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vizinhos e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é então novamente convertido no Fab' -tiol por meio de redução com mercaptoetilamina e é misturado com quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progressos recentes possibilitaram a recuperação direta de fragmentos de Fab'-SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula F(ab')₂ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' foi segregado separadamente de *E. coli* e submetido a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de ligar-se a células que sobreexpressam o recetor de HER2 e células T humanas normais, bem como iniciar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humanos.

Diversas técnicas de fabrico e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultura celular recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando fechos de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Os péptidos de fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às partes Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão genética. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de articulação para formar monómeros e, em seguida, novamente oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu mecanismo alternativo de fabrico de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligando que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios V_L e V_H

complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois locais de ligação a antigénios. Outra estratégia de fabrico de fragmentos de anticorpos biespecíficos utilizando dímeros Fv de cadeia simples (sFv) também foi relatada. Veja-se Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

São contemplados anticorpos com mais de duas valências. Podem ser preparados, por exemplo, anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) *Outras modificações de sequências de aminoácidos*
É(são) contemplada(s) modificação(ões) dos anticorpos HER2 descritos no presente documento. Pode ser desejável, por exemplo, aprimorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes de sequências de aminoácidos do anticorpo HER2 são preparadas por meio da introdução de mudanças de nucleótidos apropriadas no ácido nucleico do anticorpo HER2, ou por meio da síntese de péptidos. Essas modificações incluem, por exemplo, exclusões e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos do anticorpo HER2. Qualquer combinação de exclusão, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácidos podem também alterar processos pós-tradução do anticorpo HER2, tais como a mudança do número ou posição de locais de glicosilação.

Um método útil de identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo HER2 que são locais preferidos para mutagenese é denominado "mutagenese de varrimento de alanina", conforme descrito por Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos desejados é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como Arg, Asp, His, Lys e Glu) e substituído por aminoácido neutro ou negativamente

carregado (de maior preferência alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno de HER2. Esses locais de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são refinados em seguida por meio da introdução de outras variantes ou adicionais nos locais de substituição ou para estes. Desta forma, embora o local para introdução de uma variação de sequência de aminoácidos seja previamente determinado, a natureza intrínseca da mutação não necessita ser previamente determinada. Para analisar o desempenho de uma mutação num dado local, por exemplo, varrimento de ala ou mutagênese aleatória é conduzida no codão ou região desejada e as variantes de anticorpos HER2 expressas são selecionadas para a atividade desejada.

As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões de terminais carboxilo e/ou amino que variam de comprimento de um resíduo até polipéptidos que contenham cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequenciais de resíduos de aminoácidos isolados ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo HER2 com resíduo de metionilo N-terminal ou o anticorpo fusionado a um polipéptido citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo HER2 incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo HER2 a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipéptido que aumente a semivida do anticorpo em soro.

Outro tipo de variante é variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes contêm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo HER2 substituída por um resíduo diferente. Os locais de maior interesse para mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis ou CDRs, mas também são contempladas alterações de região Fc ou FR. Substituições conservadoras são exibidas no Quadro 1 sob o título "substituições preferidas". Caso essas substituições resultem em mudança

da atividade biológica, mudanças mais substanciais, denominadas "exemplos de substituições" no Quadro 1 ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos são selecionados.

Quadro 1

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

Modificações substanciais das propriedades biológicas do anticorpo são atingidas por meio da seleção de substituições que difiram significativamente de efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipéptido na área da substituição, tal como na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local desejado; ou (c) do

volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as similaridades das propriedades das suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, *Biochemistry*, segunda edição, págs. 73-75, Worth Publishers, Nova Iorque (1975)):

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

Alternativamente, os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

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

Substituições não conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo HER2 pode também ser substituído, geralmente com serina, para aumentar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar retícula aberrante. Por outro lado, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo para

aumentar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo for fragmento de anticorpo, tal como fragmento de Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de anticorpo parental (por exemplo, anticorpo humano ou humanizado). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas aprimoradas com relação ao anticorpo parental do qual é (são) gerado(s). Uma forma conveniente de geração dessas variantes de substituição envolve a maturação de afinidade utilizando exibição de fagos. Resumidamente, diversos locais de regiões hipervariáveis (por exemplo, seis a sete locais) sofrem mutações para gerar todas as substituições amino possíveis em cada local. As variantes de anticorpos geradas desta forma são exibidas de maneira monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos na forma de fusões para o produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes exibidas por fago são então selecionadas de acordo com a sua atividade biológica (tal como afinidade de ligação), da forma descrita no presente documento. A fim de identificar possíveis locais de regiões hipervariáveis para modificação, mutagénese de varrimento de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação a antígenos. Alternativa ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura de cristal do complexo de antígeno e anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e HER2 humano. Esses resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas no presente documento. Após a geração dessas variantes, o quadro de variantes é submetido a seleção conforme descrito no presente documento e os anticorpos com propriedades

superiores num ou mais testes relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Outro tipo de variante de aminoácidos do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alteração, designa-se a exclusão de uma ou mais frações de hidrato de carbono encontradas no anticorpo e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estejam presentes no anticorpo.

A glicosilação de anticorpos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligado designa a ligação da porção de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripéptidos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido, com exceção de prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Desta forma, a presença de qualquer dessas sequências de tripéptidos num polipéptido cria um local de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada designa a ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora também possam ser utilizadas 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida por meio da alteração da sequência de aminoácidos, de forma que contenha uma ou mais das sequências de tripéptidos descritas acima (para locais de glicosilação N-ligados). A alteração pode também ser feita por meio da adição de um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original, ou substituição por ele (para locais de glicosilação O-ligados).

Quando o anticorpo compreender uma região Fc, qualquer estrutura de oligossacárido a ele ligada pode ser alterada. Anticorpos com uma estrutura de hidrato de carbono madura que não contém fucose ligada a uma região Fc do anticorpo,

por exemplo, são descritos no Pedido de Patente Norte-Americano nº US 2003/0157108 A1, Presta, L. Veja-se também US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Anticorpos com N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisseccionada na estrutura de oligossacárido ligada a uma região Fc do anticorpo são indicados no documento WO 03/011878, Jean-Mairet *et al.*, e na Patente US nº 6.602.684, Umana *et al.* Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose numa estrutura de oligossacárido ligada a uma região Fc do anticorpo são relatados no documento WO 97/30087, Patel *et al.* Veja-se também documento WO 98/58964 (Raju, S.) e documento WO 99/22764 (Raju, S.) referentes a anticorpos com hidrato de carbono alterado ligado à sua região Fc. Composições de anticorpos que compreendem anticorpo de espécie principal com essas estruturas de hidrato de carbono ligadas a uma ou duas cadeias pesadas da região Fc são contempladas no presente documento.

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo HER2 são preparadas por meio de uma série de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas sem se limitar ao isolamento a partir de fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por meio de mutagênese mediada por oligonucleótido (ou dirigida para local), mutagênese por PCR e mutagênese de conjunto de uma variante preparada anteriormente ou versão não variante do anticorpo HER2.

(viii) Rastreo de anticorpos com as propriedades desejadas

Foram descritas acima as técnicas de geração de anticorpos. Pode-se selecionar adicionalmente anticorpos com certas características biológicas, conforme o desejado.

Para identificar um anticorpo que bloqueia a ativação de ligandos de recetor de HER, a capacidade do anticorpo de bloquear a ligação a ligandos HER a células que expressam o

recetor de HER (tal como em conjugação com outro recetor de HER com o qual o recetor de HER de interesse forma heterooligómero de HER) pode ser determinada. Células que expressam naturalmente, ou transfectadas para expressar recetores de HER do heterooligómero de HER, por exemplo, podem ser incubadas com o anticorpo e expostas em seguida a ligando de HER marcado. A capacidade do anticorpo de HER2 de bloquear a ligação a ligandos para o recetor de HER no heterooligómero de HER pode ser avaliada em seguida.

A inibição de ligação a HRG a linhas de células de tumores de mama MCF7 por anticorpos HER2, por exemplo, pode ser realizada utilizando culturas de MCF7 monocamadas sobre gelo em formato de placas com 24 poços essencialmente conforme descrito no documento WO 01/00245. Anticorpos monoclonais HER2 podem ser adicionados a cada poço e incubados por trinta minutos. rHRG β ₁₇₇₋₂₂₄ marcado com ¹²⁵I (25 pm) pode ser adicionado em seguida e a incubação pode prosseguir por 4 a 16 horas. Curvas de reação à dosagem podem ser preparadas e valor IC₅₀ pode ser calculado para o anticorpo de interesse. Numa forma de realização, o anticorpo que bloqueia a ativação de ligandos de recetor de HER terá IC₅₀ para inibir a ligação a HRG a células MCF7 neste teste de cerca de 50 nM ou menos, de maior preferência 10 nM ou menos. Quando o anticorpo for fragmento de anticorpo tal como fragmento de Fab, o IC₅₀ para inibir a ligação a HRG a células MCF7 neste teste pode ser, por exemplo, de cerca de 100 nM ou menos, de maior preferência 50 nM ou menos.

Alternativa ou adicionalmente, pode-se determinar a capacidade do anticorpo de HER2 de bloquear a fosforilação de tirosina estimulada por ligando HER de recetor HER presente em heterooligómero de HER. Células que expressam de forma endógena os recetores de HER ou transfectadas para expressá-las podem ser incubadas, por exemplo, com o anticorpo e testadas em seguida para determinar a atividade

de fosforilação de tirosina dependente de ligando de HER utilizando monoclonal anti-fosfotirosina (que é opcionalmente conjugado com marca detetável). O teste de ativação de recetor de quinase descrito na Patente US nº 5.766.863 também é disponível para determinar a ativação de recetor de HER e o bloqueio daquela atividade por anticorpo.

Pode-se seleccionar um anticorpo que iniba o estímulo por HRG de fosforilação de p180 tirosina em células MCF7, essencialmente conforme descrito no documento WO 01/00245. As células MCF7, por exemplo, podem ser colocadas em placas com 24 poços e anticorpos monoclonais para HER2 podem ser adicionados a cada poço e incubados por trinta minutos à temperatura ambiente; em seguida, pode-se adicionar rHRGp 1-177.244 a cada poço até concentração final de 0,2 nM e a incubação pode prosseguir por oito minutos. Meios podem ser aspirados de cada poço e as reações podem ser suspensas por meio da adição de 100 µl de tampão de amostra SDS (5 % de SDS, 25 mM de DTT e 25 mM de Tris-HCl, pH 6,8). Cada amostra (25 µl) pode sofrer eletroforese sobre gel de gradiente 4 a 12 % (Novex) e, em seguida, transferida eletroforéticamente para membrana de difluoreto de polivinilideno. Imunomanchas de antifosfotirosina (a 1 µg/ml) podem ser desenvolvidas e a intensidade da faixa reativa predominante a M_r ~180.000 pode ser quantificada por meio de densitometria de reflexão. O anticorpo seleccionado preferentemente inibirá significativamente o estímulo de HRG de fosforilação de p180 tirosina até cerca de 0 a 35 % do controlo neste teste. Uma curva de reacção à dosagem para inibir o estímulo por HRG de fosforilação de p180 tirosina conforme determinado por meio de densitometria de reflexão pode ser preparada e pode-se calcular IC_{50} para o anticorpo de interesse. Opcionalmente, o anticorpo que bloqueia a activação de ligandos de recetor de HER terá IC_{50} para inibir o estímulo de HRG de

fosforilação de p180 tirosina neste teste de cerca de 50 nM ou menos, de maior preferência 10 nM ou menos. Quando o anticorpo for fragmento de anticorpo tal como fragmento de Fab, o IC₅₀ para inibir o estímulo de HRG de fosforilação de p180 tirosina neste teste pode ser, por exemplo, de cerca de 100 nM ou menos, de maior preferência 50 nM ou menos.

Podem-se também determinar os efeitos inibidores do crescimento do anticorpo sobre células MDA-MB-175, tal como essencialmente conforme descrito em Schaefer et al., *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997). Segundo este teste, células MDA-MB-175 podem ser tratadas com anticorpo monoclonal HER2 (10 µg/ml) por quatro dias e manchadas com violeta de cristal. A incubação com anticorpo de HER2 pode exibir efeito inibidor do crescimento sobre esta linha celular similar ao exibido pelo anticorpo monoclonal 2C4. O HRG exógeno pode não reverter significativamente esta inibição. Preferentemente, o anticorpo será capaz de inibir a proliferação celular de células MDA-MB-175 até ponto maior que o anticorpo monoclonal 4D5 (e, opcionalmente, até ponto maior que o anticorpo monoclonal 7F3), tanto na presença quanto na ausência de HRG exógeno.

O anticorpo HER2 de interesse pode bloquear a associação dependente de herregulina de HER2 com HER3 em células MCF7 e SK-BR-3 conforme determinado em experimento de coimunoprecipitação tal como descrito no documento WO 01/00245 de forma substancialmente mais eficaz que o anticorpo monoclonal 4D5, preferentemente de forma substancialmente mais eficaz que o anticorpo monoclonal 7F3.

Para identificar anticorpos HER2 inibidores do crescimento, pode-se rastrear anticorpos que inibem o crescimento de células cancerosas que sobreexpressam HER2. Opcionalmente, o anticorpo inibidor do crescimento selecionado é capaz de inibir o crescimento de células SK-

BR-3 em cultura celular em cerca de 20 a 100 % e, preferentemente, em cerca de 50 a 100 % em concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar esses anticorpos, pode ser realizado o teste SK-BR-3 descrito na Patente US nº 5.677.171. Segundo este teste, as células SK-BR-3 são cultivadas em mistura 1:1 de F12 e meio DMEM suplementada com 10 % de soro bovino fetal, glutamina e penicilina estreptomicina. As células SK-BR-3 são colocadas em placas a 20.000 células em placa de cultura celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). 0,5 a 30 µg/ml do anticorpo HER2 são adicionados por placa. Após seis dias, a quantidade de células, em comparação com células não tratadas, é contada utilizando contador celular eletrônico COULTER™. Os anticorpos que inibem o crescimento das células SK-BR-3 em cerca de 20 a 100 % ou cerca de 50 a 100 % podem ser selecionados como anticorpos inibidores do crescimento. Veja-se a Patente US nº 5.677.171 para testes de seleção de anticorpos inibidores de crescimento, tais como 4D5 e 3E8.

A fim de selecionar anticorpos que induzem apoptose, é disponível ensaio de ligação a anexina utilizando células BT474. As células BT474 são cultivadas e semeadas em placas conforme discutido no parágrafo anterior. O meio é removido em seguida e substituído com meio novo isolado ou meio que contém 10 µg/ml do anticorpo monoclonal. Após período de incubação de três dias, monocamadas são lavadas com PBS e destacadas por meio de tripsinização. As células são centrifugadas em seguida, novamente suspensas em tampão de ligação a Ca^{2+} e parceladas em tubos conforme discutido acima para o teste de morte celular. Os tubos recebem então anexina marcada (tal como anexina V-FTIC (1 µg/ml). As amostras podem ser analisadas utilizando citômetro de fluxo FACSCAN® e software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Os anticorpos que induzem níveis estatisticamente significativos de ligação a anexina com

relação ao controlo são selecionados como anticorpos indutores da apoptose. Além do ensaio de ligação a anexina, é disponível teste de manchas de ADN utilizando células BT474. A fim de realizar este teste, células BT474 que foram tratadas com o anticorpo de interesse descrito nos dois parágrafos anteriores são incubadas com 9 µg/ml de HOECHST 33342™ por duas horas a 37 °C, analisadas em seguida em citómetro de fluxo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) utilizando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Anticorpos que induzem alteração do percentual de células apoptóticas que é de duas vezes ou mais (preferentemente três vezes ou mais) que as células não tratadas (até 100 % de células apoptóticas) podem ser selecionados como anticorpos pró-apoptóticos utilizando este teste. Veja-se documento WO 98/17797 para testes de seleção de anticorpos que induzem a apoptose, tais como 7C2 e 7F3.

Para selecionar anticorpos que se liguem a um epítopo sobre HER2 unido por anticorpo de interesse, pode-se realizar teste bloqueador cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), para determinar se o anticorpo provoca bloqueio cruzado da ligação a anticorpo, tal como 2C4 ou Pertuzumab, a HER2. Alternativa ou adicionalmente, o mapeamento de epítopos pode ser realizado por meio de métodos conhecidos na técnica e/ou pode-se estudar a estrutura de anticorpo e HER2 (Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)) para observar qual(is) domínio(s) de HER2 é (são) unido(s) pelo anticorpo.

(ix) *Imunoconjugados*

Os imunoconjugados compreendem um anticorpo conjugado a agente citotóxico tal como agente quimioterápico, toxina (tal como toxina de moléculas pequenas ou toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica,

vegetal ou animal, incluindo seus fragmentos e/ou variantes) ou isótopo radioativo (isto é, radioconjugado).

Os agentes quimioterápicos úteis na geração desses imunoconjugados foram descritos acima. Conjugados de anticorpo e uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, maitansina (Patente US nº 5.208.020), tricoteno e CC1065, também são contemplados no presente documento.

Um anticorpo pode ser conjugado a uma ou mais moléculas de maitansina (tal como cerca de uma a cerca de dez moléculas de maitansina por molécula de anticorpo). Maitansina pode ser convertida, por exemplo, em May-SS-Me, que pode ser reduzido em May-SH3 e reagido com anticorpo modificado (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para gerar um imunoconjugado de anticorpo e maitansinoide.

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo **HER2** conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir ruturas de ADN de fita dupla em concentrações subpicomolares. Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas sem se limitar a γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG e θ_1^I (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) e Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Veja-se também as Patentes US nº 5.714.586, 5.712.374, 5.264.586 e 5.773.001.

Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas que podem ser utilizados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não de ligação a toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia ricina A, cadeia A de abrina, cadeia A modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcin, crotin, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonin, mitogelin,

restrictocin, fenomicin, enomicin e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, documento WO 93/21232, publicada em 28 de Outubro de 1993.

Um imunoc conjugado pode ser formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, ribonuclease ou endonuclease de ADN, tal como desoxirribonuclease; DNase).

Uma série de isótopos radioativos é disponível para a produção de anticorpos HER2 radioconjugados. Exemplos incluem At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu.

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)- etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, imunotoxina rícina, conforme descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é exemplo de agente quelante para conjugação de radionucletídeo ao anticorpo. Veja-se documento WO 94/11026. O ligando pode ser um "ligando divisível" que possibilita a libertação do fármaco citotóxico na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, ligando instável ácido, ligando sensível a peptidase, ligando de dimetilo ou ligando que contém dissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer*

Research 52:127-131 (1992)).

Alternativamente, pode ser fabricada uma proteína de fusão que compreende o anticorpo HER2 e agente citotóxico, por exemplo, por meio de técnicas recombinantes ou síntese de péptidos.

Um anticorpo pode ser conjugado a um "recetor" (tal como estreptavidina) para uso em direcionamento prévio do tumor, em que o conjugado de anticorpo e recetor é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não unido da circulação, utilizando agente limpante e, em seguida, administração de "ligando" (tal como avidina) que é conjugado a agente citotóxico (tal como radionucleótido).

(x) Outras modificações de anticorpos

Outras modificações do anticorpo são contempladas no presente documento. O anticorpo pode ser ligado, por exemplo, a um dentre uma série de polímeros não proteáceos, tais como polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo pode também ser capturado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por meio de técnicas de acumulação ou polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respetivamente) em sistemas de fornecimento de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edição, Oslo, A., Ed. (1980).

Pode ser desejável modificar o anticorpo de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, por exemplo, de forma a aumentar a citotoxicidade mediada por células dependente de antigénios (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isso pode ser atingido por meio da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos numa região Fc do anticorpo.

Alternativa ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, de forma a permitir a formação de uniões de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico gerado desta forma pode possuir capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular mediada por complemento aprimorada e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Veja-se Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B., *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aumentada podem também ser preparados utilizando reticulantes heterobifuncionais, conforme descrito em Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser construído um anticorpo que possui regiões Fc duplas e pode, portanto, apresentar capacidades de ADCC e lise de complemento aprimoradas. Veja-se Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

O documento WO 00/42072 (Presta, L.) descreve anticorpos com função ADCC aprimorada na presença de células efectoras humanas, em que os anticorpos compreendem substituições de aminoácidos na sua região Fc. Preferentemente, o anticorpo com ADCC aprimorado compreende substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc. Preferentemente, a região Fc alterada é região Fc de IgG1 humano que compreende ou consiste em substituições numa, duas ou três destas posições.

Anticorpos com ligação a CIq alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) são descritos no documento WO 99/51642, Patente US nº 6.194.551 B1, Patente US nº 6.242.195 B1, Patente US nº 6.528.624 B1 e Patente US nº 6.538.124 B1 (Idusogie *et al.*). Os anticorpos compreendem uma substituição de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da sua região Fc.

Para aumentar a semivida do anticorpo em soro, pode-se

incorporar um epítopo de ligação a recetor de salvados ao anticorpo (especialmente fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na Patente US nº 5.739.277. Da forma utilizada no presente documento, a expressão "epítopo de ligação a recetor de salvados" designa um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da semivida em soro *in vivo* da molécula de IgG. Anticorpos com substituições numa de suas regiões Fc e maior semivida em soro também são descritos no documento WO 00/42072 (Presta, L).

Anticorpos elaborados com três ou mais (preferentemente quatro) locais de ligação a antígenos funcionais também são contemplados (Pedido de Patente US nº US 2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Os anticorpos HER2 descritos no presente documento podem também ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas que contêm o anticorpo são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); Patentes US nº 4.485.045 e 4.544.545; e documento WO 97/38731 publicado em 23 de Outubro de 1997. Lipossomas com maior tempo de circulação são descritos na Patente US nº 5.013.556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados por meio do método de evaporação de fase reversa com composição de lipídios que compreende fosfatidileolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros com tamanho de poro definido para gerar lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' do anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas descritos em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286- 288 (1982) por meio de reação de permuta de dissulfetos. Um agente quimioterápico é opcionalmente contido no interior

do lipossoma. Veja-se Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81 (19) 1484 (1989).

IV. Formulações Farmacêuticas

Formulações terapêuticas das composições de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenagem por meio de mistura da composição com veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabéns tais como metil ou propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol e m- cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de dez resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contraíões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (tais como complexos de Zn e proteína); e/ou tensioativos não iônicos, tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). Exemplos de formulações de anticorpos **HER2** liofilizadas são descritos no documento WO 97/04801.

A formulação do presente documento pode também conter mais de um composto ativo conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferentemente aqueles com atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Pode ser desejável, por exemplo, fornecer adicionalmente anticorpos que se liguem a EGFR, HER2 (tal como anticorpo que liga epítipo diferente sobre HER2), HER3, HER4 ou fator endotelial vascular (VEGF) na formulação única. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode compreender adicionalmente agente quimioterápico, agente citotóxico, citoquina, agente inibidor do crescimento, agente anti-hormonal, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inibidor da tirosina quinase e/ou cardioprotetor. Essas moléculas encontram-se adequadamente presentes em combinação, em quantidades que são eficazes para o propósito desejado.

Os ingredientes ativos podem também ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por métodos de aglutinação ou por polimerização interfacial, tais como microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respetivamente, em sistemas de fornecimento de fármacos coloidais (tais como lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser fabricadas preparações de libertação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes com libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou álcool (poli)vinílico, poliláctidos (Patente US n° 3.773.919), copolímeros de

ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ etilo, etileno-vinil acetato não degradável, copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico degradáveis tais como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

V. Seleção de Pacientes para Terapêutica

Um paciente selecionado para terapêutica pode ter um tumor ou outra célula ou tecido que exibe ativação de HER (e, preferentemente, HER2). A extensão da ativação de HER (ou HER2) em células cancerosas ou outras células testadas excede significativamente o nível de ativação daquele recetor em células não cancerosas ou células normais do mesmo tipo de tecido. Essa ativação excessiva pode resultar da sobreexpressão do recetor de HER e/ou níveis maiores que os normais de ligando de HER disponível para ativar o recetor de HER nas células cancerosas. Essa ativação excessiva pode causar e/ou ser causada pelo estado maligno de células cancerosas. Opcionalmente, o cancro será submetido a teste de diagnóstico ou prognóstico para determinar se está ocorrendo a amplificação e/ou a sobreexpressão de recetor de HER, o que resulta nessa ativação excessiva do recetor de HER. Alternativa ou adicionalmente, o cancro pode ser submetido a teste de diagnóstico ou prognóstico para determinar se está ocorrendo a amplificação e/ou a sobreexpressão de ligando de HER no cancro que contribua para a ativação excessiva do recetor. Em subconjunto desses cancros, pode resultar ativação excessiva do recetor de um processo estimulador

autócrino. Vários exemplos de testes para determinar a ativação de HER serão descritos em mais pormenores abaixo.

(i) Dímeros de HER

Amostras podem ser testadas para determinar a presença de dímeros de HER, como indicando ativação de HER2 ou HER. Qualquer método conhecido na técnica pode ser utilizado para detetar dímeros de HER2, tais como EGFR-HER2, HER2-HER3. Vários métodos preferidos são descritos a seguir. Estes métodos detetam interações entre proteínas não covalentes ou indicam de outra forma a proximidade entre proteínas de interesse.

Métodos com base em imunoafinidade, tais como imunoprecipitação ou ELISA, podem ser utilizados para detetar dímeros de HER. Numa forma de realização, anticorpos de HER2 são utilizados para imunoprecipitar complexos que compreendem HER2 de células tumorais e o imunoprecipitante resultante é sondado em seguida para determinar a presença de EGFR ou HER3 por meio de imunomanchas. Em outra realização, anticorpos EGFR ou HER3 podem ser utilizados para a etapa de imunoprecipitação e o imunoprecipitante é sondado em seguida com anticorpos HER2. Numa forma de realização adicional, ligandos de HER específicos para EGFR, HER3, complexos de EGFR e HER2 ou complexos de HER e HER3 podem ser utilizados para precipitar complexos, que são sondados em seguida para determinar a presença de HER2. Ligandos podem ser conjugados, por exemplo, a avidina e os complexos purificados sobre coluna de biotina.

Em outras formas de realização, tais como ELISA ou testes do tipo "sanduíche" de anticorpos, os anticorpos para HER2 são imobilizados sobre suporte sólido, colocados em contato com células tumorais ou lisato de células tumorais, lavados e expostos em seguida a anticorpo contra EGFR ou HER3. A ligação do último anticorpo, que pode ser detetada diretamente ou por anticorpo secundário conjugado

a marca detetável, indica a presença de heterodímeros. Em certas formas de realização, anticorpo HER3 ou EGFR é imobilizado e anticorpo HER2 é utilizado para a etapa de detecção. Em outras formas de realização, ligandos de HER podem ser utilizados no lugar de anticorpos de HER ou em combinação com estes.

A reticulação por UV ou química pode também ser utilizada para ligar covalentemente dímeros sobre a superfície de células vivas. Hunter *et al.*, *Biochem. J.*, 320: 847-53. Exemplos de reticulantes químicos incluem ditiobis(succinimidil) propionato (DSP) e 3,3'-ditiobis(sulfossuccinimidil) propionato (DTSSP). Numa forma de realização, extratos celulares de células de tumores reticuladas quimicamente são analisados por meio de SDS-PAGE e imunomanchados com anticorpos para EGFR e/ou HER3. Uma banda superalterada com peso molecular apropriado muito provavelmente representa dímeros de EGFR-HER2 ou HER2-HER3, uma vez que **HER2** é o parceiro de dimerização preferido para EGFR e HER3. Este resultado pode ser confirmado por meio de imunomanchas subsequentes com anticorpos **HER2**.

A transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) pode também ser utilizada para detetar dímeros de EGFR-HER2 ou HER2-HER3. FRET deteta alterações conformacionais de proteínas e interações entre proteínas *in vivo* e *in vitro* com base na transferência de energia de fluoroforo dador para fluoroforo recetor. Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7: 730-34 (2000). A transferência de energia tem lugar somente se o fluoroforo dador encontrar-se em proximidade suficiente do fluoroforo recetor. Em experimento FRET típico, duas proteínas ou dois locais sobre uma única proteína são marcados com sondas fluorescentes diferentes. Uma das sondas, a sonda dadora, é excitada até estado de energia superior por luz incidente com comprimento de onda especificado. A sonda dadora transmite em seguida a sua energia para a segunda sonda, a

sonda recetora, o que resulta em redução da intensidade de fluorescência do dador e aumento da emissão de fluorescência do recetor. Para medir a extensão da transferência de energia, a intensidade do dador em amostra marcada com sondas doadoras e recetoras é comparada com a sua intensidade em amostra marcada somente com sonda dadora. Opcionalmente, a intensidade do recetor é comparada em amostras de dador e recetor e somente de recetor. Sondas apropriadas são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, tinturas permeantes de membranas, tais como fluoresceína e rodamina, tinturas orgânicas, tais como tinturas de cianina e átomos de lantanídeos. Selvin, acima. Métodos e instrumentação para detetar e medir transferência de energia também são conhecidos na técnica. Selvin, acima.

Técnicas com base em FRET adequadas para detetar e medir interações entre proteínas em células individuais também são conhecidas na especialidade. Microscopia de transferência de energia por ressonância de fluorescência fotomanchadora (pbFRET) de dador e microscopia de formação de imagens vitalícia por fluorescência (FLIM), por exemplo, podem ser utilizadas para detetar a dimerização de recetores da superfície celular. Selvin, acima; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129: 1543-58 (1995). Numa forma de realização, pbFRET é utilizada sobre células "em suspensão" ou *in situ* para detetar e medir a formação de dímeros de EGFR e HER2 ou HER2 e HER3, conforme descrito em Nagy *et al.*, *Cytometry*, 32: 120-131 (1998). Estas técnicas medem a redução do tempo de vida de fluorescência do dador devido à transferência de energia.

Pode-se utilizar uma técnica de FRET do tipo Foerster citométrico de fluxo (FCET) para investigar a dimerização de EGFR e F1ER2 e HER2 e HER3, conforme descrito em Nagy *et al.*, acima, e Brockhoff *et al.*, *Cytometry*, 44: 338-48 (2001).

FRET é utilizado preferentemente em conjunto com

métodos de marcação imunohistoquímica padrão. Kenworthy, *Methods*, 24: 289-96 (2001). Anticorpos conjugados a tinturas fluorescentes apropriadas, por exemplo, podem ser utilizados como sondas para marcação de duas proteínas diferentes. Caso as proteínas se encontrem próximas entre si, as tinturas fluorescentes agem como dadores e recetores para FRET. A transferência de energia é detetada por meios padrão. A transferência de energia pode ser detetada por meios citométricos de fluxo ou por sistemas de microscopia digital, tais como microscopia confocal ou microscopia de fluorescência de campo amplo acoplada a câmara de dispositivo acoplado a carga (CCD).

Opcionalmente, anticorpos HER2 e anticorpos EGFR ou HER3 são marcados diretamente com dois fluoróforos diferentes, tal como conforme descrito em Nagy *et al.*, acima. Células de tumores ou lisatos de células de tumores são colocados em contato com anticorpos marcados de forma diferencial, que agem como dadores e recetores para FRET na presença de dímeros de EGFR e HER2 ou HER2 e HER3. Alternativamente, anticorpos não marcados contra HER2 e EGFR ou HER3 são utilizados junto com anticorpos secundários marcados de forma diferencial que servem de dadores e recetores. Veja-se, por exemplo, Brockhoff *et al.*, acima. A transferência de energia é detetada e a presença de dímeros é determinada caso as marcas sejam encontradas em boa proximidade.

Ligandos de recetores de HER que são específicos para HER2 e EGFR ou HER3 podem ser marcados de forma fluorescente e utilizados para estudos FRET.

A presença de dímeros sobre a superfície de células de tumores é demonstrada por meio de colocação de HER2 com EGFR ou HER3 utilizando métodos de imunofluorescência direta ou indireta padrão e microscopia de varrimento a laser confocal. Alternativamente, formação de imagens por varrimento a laser (LSI) é utilizada para detetar a ligação

a anticorpos e colocalização de HER2 com EGFR ou HER3 em formato de alto rendimento, tal como placa de micropoços, conforme descrito em Zuck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11122-27 (1999).

A presença de dímeros de EGFR e HER2 e/ou HER2 e HER3 é determinada identificando-se atividade enzimática que é dependente da proximidade dos componentes dos dímeros. Anticorpo HER2 é conjugado com uma enzima e anticorpo EGFR ou HER3 é conjugado com segunda enzima. Primeiro substrato para a primeira enzima é adicionado e a reação produz segundo substrato para a segunda enzima. Isso gera reação com outra molécula para produzir composto detetável, tal como tintura. A presença de outra substância decompõe o segundo substrato, de forma que a reação com a segunda enzima é evitada, a não ser que as primeira e segunda enzimas, e desta forma os dois anticorpos, encontrem-se em boa proximidade. Numa forma de realização específica, células de tumores ou lisatos celulares são colocados em contato com anticorpo HER2 que é conjugado com glicose oxidase e anticorpo HER3 ou HER1 que é conjugado com peroxidase de rabanete silvestre. Adiciona-se glicose à reação, junto com precursor de tintura, tal como DAB, e catalase. A presença de dímeros é determinada pelo desenvolvimento de coloração mediante manchas para DAB.

Os dímeros podem também ser detetados utilizando métodos com base no sistema de teste eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View CA), conforme descrito, por exemplo, no Pedido de Patente US nº 2001/0049105, publicado em 6 de Dezembro de 2001. eTag™, ou "marca eletroforética", compreende porção recetora detetável, tal como grupo fluorescente. Ela pode também compreender "modificador da mobilidade", que consiste essencialmente de porção que possui mobilidade eletroforética exclusiva. Estas porções permitem a separação e deteção da eTag™ a partir de mistura complexa sob condições eletroforéticas definidas, tais como

eletroforese capilar (CE). A porção da eTag™ que contém a porção relatora e, opcionalmente, o modificador da mobilidade, é ligada a primeira fração de ligação alvo por grupo ligando divisível para produzir primeiro composto de ligação. A primeira fração de ligação alvo reconhece especificamente primeiro alvo específico, tal como ácido nucleico ou proteína. A primeira fração de ligação alvo não é limitada de nenhuma forma e pode ser, por exemplo, polinucleótido ou polipéptido. Preferentemente, a primeira fração de ligação alvo é um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Alternativamente, a primeira fração de ligação alvo pode ser ligando recetor de HER ou seu fragmento competente de ligação.

O grupo de ligação compreende preferentemente uma fração clivável, tal como substrato de enzima, ou qualquer ligação química que possa ser dividida sob condições definidas. Quando a primeira fração de ligação alvo liga-se ao seu alvo, o agente de clivagem é introduzido e/ou ativado e o grupo ligando é dividido, de forma a liberar a porção de eTag™ que contém a porção relatora e modificador da mobilidade. Desta forma, a presença de eTag™ "livre" indica a ligação da fração de ligação alvo ao seu alvo.

Preferentemente, o segundo composto de ligação compreende o agente de clivagem e a segunda fração de ligação alvo que reconhece especificamente o segundo alvo. A segunda fração de ligação alvo também não é limitada, de nenhuma forma, e pode ser, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo ou ligando recetor de HER ou fragmento de ligando competente de ligação. O agente de clivagem é tal que clivará apenas o grupo ligando no primeiro composto de ligação caso o primeiro composto de ligação e o segundo composto de ligação estejam em boa proximidade.

Opcionalmente, um primeiro composto de ligação compreende eTag™ na qual anticorpo para HER2 serve de

primeira fração de ligação alvo. Segundo composto de ligação compreende anticorpo para EGFR ou HER3 unido a agente de clivagem capaz de dividir o grupo ligando da eTag™. Preferentemente, o agente de clivagem deve ser ativado, a fim de poder dividir o grupo de ligação. Células de tumores ou lisatos de células de tumores são colocados em contato com a eTag™, que se liga a HER2 e com o anticorpo EGFR ou HER3 modificado, que se liga a EGFR ou HER3 sobre a superfície celular. Composto de ligação não unido é preferentemente removido e o agente de clivagem é ativado, se for necessário. Caso estejam presentes dímeros de EGFR e HER2 ou HER2 e HER3, o agente de clivagem dividirá o grupo de ligação e liberará a eTag™ devido à proximidade entre o agente de clivagem e o grupo de ligação. eTag™ livre pode ser detetada em seguida por meio de qualquer método conhecido na técnica, tal como eletroforese capilar.

Opcionalmente, um agente de clivagem é uma substância química ativável que age sobre o grupo de ligação. O agente de clivagem pode ser ativado, por exemplo, expondo-se a amostra à luz.

Opcionalmente, a eTag™ é construída utilizando anticorpo para EGFR ou HER3 como a primeira fração de ligação alvo e o segundo composto de ligação é construído a partir de anticorpo para HER2.

Opcionalmente, o dímero de HER é detetado utilizando anticorpo ou outro reagente que se liga específica ou preferentemente ao dímero em comparação com a sua ligação a qualquer recetor de HER no dímero.

(ii) Fosforilação de HER2

Imunoprecipitação com anticorpo EGFR, HER2 ou HER3 conforme discutido no capítulo anterior pode ser opcionalmente seguida por teste funcional para dímeros, como alternativa ou suplemento para imunomanchas. Opcionalmente, a imunoprecipitação com anticorpo HER3 é

seguida por teste para determinar a atividade de tirosina quinase recetora no imunoprecipitador. Como HER3 não possui atividade de tirosina quinase intrínseca, a presença de atividade de tirosina quinase no imunoprecipitante indica que HER3 é mais provavelmente associado com HER2. Graus-Porta *et al.*, *EMBO J.*, 16: 1647-55 (1997); Klapper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4995-5000 (1999). Este resultado pode ser confirmado por meio de imunomanchas com anticorpos HER2. Opcionalmente, a imunoprecipitação com anticorpo HER2 é seguida por teste para determinar a atividade de tirosina quinase recetora de EGFR. Neste ensaio, o imunoprecipitante é colocado em contato com ATP radioativo e substrato de péptido que imita o local *in vivo* de transfosforilação de HER2 por EGFR. A fosforilação do péptido indica coimunoprecipitação e, desta forma, a dimerização de EGFR com HER2. Ensaio de atividade de tirosina quinase recetora são bem conhecidos na técnica e incluem ensaios que detetam a fosforilação de substratos alvo, tais como por anticorpo de fosfotirosina, e a ativação de processos de transdução de sinal cognatos, tais como o processo de MAPK.

A fosforilação de recetor de HER pode ser determinada por meio de imunoprecipitação de um ou mais recetores de HER, tais como recetor de HER2 (HER2), e análise Western Blot. A positividade é determinada, por exemplo, por meio da presença de banda fosfo-HER2 sobre o gel, utilizando anticorpo anti-fosfotirosina para detetar resíduo(s) de tirosina fosforilado(s) no(s) recetor(es) de HER imunoprecipitado(s). Anticorpos anti-fosfotirosina são disponíveis comercialmente por meio da PanVera (Madison WI), subsidiária da Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula CA) ou Upstate Biotechnology (Lake Placid NY). A negatividade é determinada pela ausência da banda.

Opcionalmente, a fosforilação de recetor de HER2 (HER2) é determinada por meio de imunohistoquímica

utilizando anticorpo HER2 fosfoespecífico (clone PN2A; Thor et al., *J. Clin. Oncol*, 18 (18): 3230-3239 (2000)).

Outros métodos de deteção da fosforilação de recetor(es) de HER incluem, mas sem se limitar a KIRA ELISA (Patentes US nº 5.766.863, 5.891.650, 5.914.237, 6.025.145 e 6.287.784), espectrometria de massa (comparando o tamanho de HER2 fosforilado e não fosforilado) e teste de proximidade de e-tag com anticorpo HER (tal como HER2) e anticorpo fosfoespecífico ou específico de fosfotirosina (utilizando, por exemplo, o kit de teste eTag™ disponível por meio da Aclara BioSciences (Mountain View CA). Pormenores do ensaio de eTag são descritos acima.

Podem-se também utilizar anticorpos fosfoespecíficos em conjunto celular para detetar a situação de fosforilação em amostra celular de proteína de transdução de sinal (US 2003/0190689).

(iii) *Ligandos de HER2*

Os níveis de ligando de HER, tais como TGF- α , no tumor ou em associação com ele podem ser determinados de acordo com procedimentos conhecidos. Estes ensaios podem detetar proteína e/ou ácido nucleico que o codifica na amostra a ser testada. Numa forma de realização, os níveis de ligando HER no tumor podem ser determinados utilizando imunohistoquímica (IHC); veja-se, por exemplo, Scher et al., *Clin. Cancer Research* 1: 545-550 (1995). Alternativa ou adicionalmente, pode-se avaliar os níveis de ácido nucleico que codifica ligando de HER na amostra a ser testada; tal como por meio das técnicas de FISH, Southern Blotting, ou PCR.

(iv) *Cancro que não sobreexpressa HER2*

Embora o cancro possa ser caracterizado pela sobreexpressão do recetor de HER2, o presente pedido refere-se a um método de tratamento de cancro que não é considerado sobreexpressando HER2.

Para determinar a expressão de HER2 no cancro, são

disponíveis diversos ensaios de diagnóstico/prognóstico. Numa forma de realização, a sobreexpressão de HER2 pode ser analisada por meio de IHC, utilizando, por exemplo, o HERCEPTEST® (Dako). Seções de tecidos embutidas em parafina da biópsia de um tumor podem ser submetidas ao teste de IHC de acordo com os critérios de intensidade de manchas de proteína HER2 a seguir:

Nota 0: não se observa nenhuma mancha ou a mancha de membranas é observada em menos de 10 % de células tumorais.

Nota 1+: é detetada mancha de membrana fraca/pouco perceptível em mais de 10 % das células tumorais. As células somente são manchadas em parte da sua membrana.

Nota 2+: é detetada mancha de membrana fraca a moderada em mais de 10 % das células tumorais.

Nota 3+: é detetada mancha de membrana moderada a forte em mais de 10 % das células tumorais.

Os tumores com notas 0 ou 1+ para determinação da sobreexpressão de HER2 podem ser caracterizados como não sobreexpressando HER2, enquanto os tumores com notas 2+ ou 3+ podem ser caracterizados como sobreexpressando HER2.

Os tumores que sobreexpressam HER2 são avaliados por meio de avaliações imunohistoquímicas correspondentes à quantidade de cópias de moléculas HER2 expressas por célula e podem ser determinados bioquimicamente:

0 = 0-10.000 cópias/célula;

1+ = pelo menos cerca de 200.000 cópias/célula;

2+ = pelo menos cerca de 500.000 cópias/célula;

3+ = pelo menos cerca de 2.000.000 cópias/célula;

A sobreexpressão de HER2 no nível 3+, que gera ativação independente de ligandos da tirosina quinase (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7159-7163 (1987)), ocorre em cerca de 30 % de cancros de mama e, nestes pacientes, a sobrevivência livre de reincidência e a sobrevivência geral são reduzidas (Slamon *et al.*, *Science*,

244: 707-712 (1989); Slamon *et al.*, *Science*, 235: 177-182 (1987)). Alternativa ou adicionalmente, testes FISH tais como INFORM™ (vendido pela Ventana, Arizona) ou PATHVISION™ (Vysis, Illinois) podem ser conduzidos sobre tecido tumoral embutido em parafina e fixo por formalina, para determinar a extensão (se houver) da sobreexpressão de HER2 no tumor.

Opcionalmente, o cancro será aquele que expressa (e pode sobreexpressar) EGFR, em que essa expressão pode ser avaliada quanto aos métodos de avaliação da expressão de HER2 conforme indicado acima.

A amplificação ou sobreexpressão de ligandos de HER ou recetor de HER pode também ser avaliada utilizando um ensaio diagnóstico *in vivo*, por exemplo, por meio da administração de uma molécula (tal como um anticorpo) que une a molécula a ser detetada e seja marcada com marcador detetável (por exemplo, isótopo radioativo) e varrimento externo do paciente para localização do marcador.

VI. Tratamento com a Composição de Anticorpo HER2

Contempla-se que, de acordo com a presente invenção, o anticorpo HER2 pode ser utilizado para o tratamento de cancro. O cancro compreenderá geralmente células que expressem HER2, de tal forma que o anticorpo HER2 do presente seja capaz de ligar-se às células cancerosas. Os vários cancros que podem ser tratados com a composição encontram-se relacionados no capítulo de definições acima.

Também se contempla que o anticorpo HER2 pode ser utilizado para o tratamento de diversas doenças ou disfunções não malignas, tais como disfunções autoimunes, como doença autoimune (por exemplo, psoríase); endometriose; escleroderma; restenose; pólipos, tais como pólipos do cólon, pólipos nasais ou pólipos gastrointestinais; fibroadenoma; doença respiratória;

colecistite; neurofibromatose; doença renal policística; doenças inflamatórias; disfunções da pele, incluindo psoríase e dermatite; doença vascular; condições que envolvam a proliferação anormal de células epiteliais vasculares; úlceras gastrointestinais; doença de Menetrier; adenomas de secreção ou síndrome de perda de proteínas; disfunções renais; disfunções angiogénicas; doenças oculares tais como degeneração macular relativa à idade, síndrome de histoplasmose ocular presumida, neovascularização da retina causada por retinopatia diabética proliferativa, vascularização da retina, retinopatia diabética ou degeneração macular relacionada com a idade; patologias associadas a ossos, tais como osteoartrite, raquitismo e osteoporose; lesões após evento isquémico cerebral, doenças de edemia ou fibróticas tais como cirrose hepática, fibrose pulmonar, carcoidose, tireoidite, síndrome de hiperviscosidade sistémica, doença de Osler Weber-Rendu, doença pulmonar oclusiva crónica ou edema após queimaduras, trauma, radiação, apoplexia, hipoxia ou isquemia; reação de hipersensibilidade da pele; retinopatia diabética e nefropatia diabética; síndrome de Guillain-Barre; doença de enxerto contra hospedeiro ou rejeição de transplante; doença de Paget; inflamação dos ossos ou das juntas; fotoenvelhecimento (tal como causado por radiação UV da pele humana); hipertrofia prostética benigna; certas infeções microbianas que incluem agentes patogénicos microbianos selecionados a partir de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp* e *Bordetella pertussis*; trombo causado pela agregação de plaquetas; condições reprodutivas tais como endometriose, síndrome de hiperestimulação do ovário, pré-eclampsia, sangramento uterino por disfunção ou menometrorragia; sinovite; ateroma; nefropatias aguda e crónica (incluindo glomerulonefrite proliferativa e doença renal induzida por diabete); eczema; formação de cicatrizes hipertróficas;

choque endotóxico e infecções fúngicas; polipose adenomatosa familiar; doenças neurodegenerativas (tais como doença de Alzheimer, demência relativa à AIDS, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, retinite pigmentosa, atrofia muscular espinhal e degeneração cerebelar); síndromes mielodisplásticas; anemia aplástica; lesões isquêmicas; fibrose do pulmão, rim ou fígado; doença de hipersensibilidade mediada por células T; estenose pilórica hipertrófica infantil; síndrome obstrutiva urinária; artrite psoriática; e tireoidite de Hashimoto. Indicações não malignas preferidas para terapêutica no presente documento incluem psoríase, endometriose, escleroderma, doença vascular (tal como restenose, arteriosclerose, doença das artérias coronarianas ou hipertensão), pólipos do cólon, fibroadenoma ou doenças respiratórias (tais como asma, bronquite crônica, bronquioectase ou fibrose cística).

O tratamento com o anticorpo HER2 resultará em melhoria dos sinais ou sintomas da doença. Quando a doença sendo tratada for cancro, por exemplo, essa terapêutica pode resultar em aumento da sobrevivência (sobrevivência geral e/ou sobrevivência livre de progresso) e/ou pode resultar em reação clínica objetiva (parcial ou completa).

Preferentemente, o anticorpo HER2 na composição administrada é um anticorpo nu. Entretanto, o anticorpo HER2 administrado pode ser conjugado com agente citotóxico. Preferentemente, o imunoconjugado e/ou proteína HER2 ao qual é unido é(são) internalizado(s) pela célula, resultando em maior eficácia terapêutica do imunoconjugado para matar a célula cancerosa à qual se liga. Opcionalmente, o agente citotóxico dirige-se ou interfere com o ácido nucleico na célula cancerosa. Exemplos desses agentes citotóxicos incluem maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleases e endonucleases de ADN. O anticorpo HER2 pode ser administrado a pacientes humanos de

acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, na forma de mistura ou de infusão contínua ao longo de período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutânea, intraarticular, intrassinovial, intratecal, oral, tópica ou inalatória. Prefere-se administração intravenosa da composição de anticorpo.

Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada de anticorpo HER2 dependerá do tipo de doença a ser tratado, conforme definido acima, da severidade e do curso da doença, se o anticorpo HER2 for administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapêutica anterior, histórico clínico do paciente e reação ao anticorpo HER2 e do critério do médico atendente. O anticorpo HER2 é administrado adequadamente ao paciente numa vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 50 mg/kg (tal como 0,1 a 20 mg/kg) de anticorpo HER2 é possível dose inicial para administração ao paciente, seja, por exemplo, por meio de uma ou mais administrações separadas ou por meio de infusão contínua. O tempo de infusão inicial para o anticorpo HER2 pode ser mais longo que tempos de infusão subsequentes, tal como cerca de noventa minutos para a infusão inicial e cerca de trinta minutos para infusões subsequentes (caso a infusão inicial seja bem tolerada). A dosagem preferida do anticorpo HER2 estará no intervalo de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Desta forma, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ou 10 mg/kg (ou qualquer de suas combinações) podem ser administradas ao paciente. Essas doses podem ser administradas intermitentemente, tal como semanalmente ou a cada três semanas (por exemplo, de tal forma que o paciente receba cerca de duas a cerca de vinte, tal como cerca de seis doses do anticorpo HER2). Dose de carregamento mais alta inicial, seguida por uma ou

mais doses mais baixas, pode ser administrada. O anticorpo HER2 pode ser administrado na forma de dose de carregamento de cerca de 840 mg seguida por cerca de 420 mg a cada cerca de três semanas. O anticorpo HER2 pode ser administrado na forma de dose de cerca de 1050 mg administrada aproximadamente a cada três semanas.

Outros agentes terapêuticos podem ser combinados com o anticorpo HER2. Essa administração combinada inclui coadministração ou administração simultânea, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva em qualquer ordem, em que há preferentemente um período de tempo em que ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente as suas atividades biológicas. Desta forma, o outro agente terapêutico pode ser administrado antes ou depois da administração do anticorpo HER2. O tempo entre pelo menos uma administração do outro agente terapêutico e pelo menos uma administração do anticorpo HER2 é preferentemente de cerca de um mês ou menos e, de preferência superior, cerca de duas semanas ou menos. Alternativamente, o outro agente terapêutico e o anticorpo HER2 são administrados simultaneamente ao paciente, numa única formulação ou formulações separadas.

Exemplos de outros agentes terapêuticos que podem ser combinados com o anticorpo HER2 incluem qualquer um ou mais dentre: agente quimioterápico, tal como antimetabólito, por exemplo gemcitabina; segundo anticorpo HER2 diferente (tal como anticorpo HER2 inibidor do crescimento como Trastuzumab, ou anticorpo HER2 que induz a apoptose de célula que sobreexpressa HER2, tal como 7C2, 7F3 ou suas variantes humanizadas); segundo anticorpo dirigido contra outro antígeno associado a tumor, tal como EGFR, HER3, HER4; composto anti-hormonal, tal como composto anti-estrogénios como tamoxifeno, ou inibidor da aromatase; cardioprotetor (para evitar ou reduzir qualquer disfunção

do miocárdio associada à terapêutica); citoquina; fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA®, IRESSA® ou Cetuximab); agente anti-angiogénico (especialmente Bevacizumab vendido pela Genentech com a marca comercial AVASTIN™); inibidor da tirosina quinase; inibidor de COX (tal como inibidor de COX-1 ou COX-2); fármaco anti-inflamatório não esteroideal, Celecoxib (CELEBREX®); inibidor de farnesil transferase (tal como Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponível por meio da Johnson & Johnson ou Lonafarnib SCH66336 disponível por meio da Schering-Plough); anticorpo que liga proteína oncofetal CA 125, tal como Oregovomab (MoAb B43.13); vacina HER2 (tal como vacina HER2 AutoVac da Pharmexia, ou vacina de proteína APC8024 da Dendreon, ou vacina de péptido HER2 da GSK/Corixa); outra terapêutica direcionadora de HER (tal como trastuzumab, cetuximab, gelfitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc.); Raf e/ou inibidor de ras (veja-se, por exemplo, documento WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; medicamento que trata de náusea, tal como antagonista de serotonina, esteroide ou benzodiazepina; medicamento que evita ou trata de erupções da pele ou terapêuticas contra a acne padrão, que incluem antibiótico oral ou local; medicamento redutor da temperatura do corpo, tal como acetaminofen, difenidramina ou meperidina; fator de crescimento hematopoiético etc.

Dosagens apropriadas para qualquer dos agentes coadministrados acima são as utilizadas atualmente e podem ser reduzidas devido à ação combinada (sinergia) do agente e anticorpo HER2. O tratamento com a combinação da composição de anticorpo HER2 e outro agente terapêutico pode resultar em benefício terapêutico sinérgico, ou maior que aditivo, para o paciente.

Caso seja administrado um agente quimioterápico, ele normalmente é administrado em dosagens conhecidas para tanto ou opcionalmente reduzidas devido à ação combinada das fármacos ou efeitos colaterais negativos que podem ser

atribuídos à administração do agente quimioterápico. Cronogramas de preparação e dosagem para esses agentes quimioterápicos podem ser utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes ou conforme determinado empiricamente pelos peritos na especialidade. Cronogramas de preparação e dosagem para essa quimioterapia também são descritos em *Chemotherapy Service*, Ed. M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore MD (1992).

Além dos regimes terapêuticos acima, o paciente pode ser submetido à remoção cirúrgica de células cancerosas e/ou terapêutica de radiação.

VII. Depósito de Materiais

As linhas de células de hibridoma a seguir foram depositadas na Coleção Americana de Culturas Celulares, 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209, Estados Unidos (ATCC):

Designação de Anticorpo	ATCC nº	Data de Depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de Outubro de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de Outubro de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de Maio de 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de Abril de 1999

Pormenores adicionais da presente invenção são ilustrados pelo Exemplo não limitativo que se segue.

EXEMPLO

CARATERIZAÇÃO DE COMPOSIÇÕES DE PERTUZUMAB

Pertuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, gerado com base em estrutura IgG1 (□) humana. Compreende duas cadeias pesadas (448 resíduos) e duas cadeias leves (214 resíduos). As duas cadeias pesadas são ligadas por dois dissulfetos intercadeias e cada cadeia

leve é ligada a cadeia pesada por meio de um dissulfeto intercadeias. Existe um local de glicosilação N-ligado na região Fc de pertuzumab em Asn-299 das duas cadeias pesadas. Pertuzumab difere de HERCEPTIN® (Trastuzumab) nas regiões de ligação a epítomos da cadeia leve (doze diferenças de aminoácidos) e da cadeia pesada (trinta diferenças de aminoácidos). Como resultado destas diferenças, pertuzumab liga-se a um epítipo completamente diferente sobre o recetor de HER2. A ligação a pertuzumab ao recetor de HER2 sobre células epiteliais humanas evita a formação de complexos com outros membros da família de recetores de HER (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)). Ao bloquear a formação de complexos, pertuzumab evita os efeitos estimulantes do crescimento de ligandos para os complexos (tais como EGF e heregulina). Experimentos *in vitro* demonstraram que tanto pertuzumab quanto pertuzumab-Fab inibem a ligação a heregulina (HRG) a células MCF7 e que a fosforilação estimulada por HRG do complexo HER2-HER3 pode ser inibida por pertuzumab e pertuzumab-Fab (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)). Além disso, concluiu-se que a inibição *in vivo* do crescimento de tumores por pertuzumab e Fab derivado de polietileno glicol de pertuzumab é comparável em modelo de xenoenxerto de cancro da próstata murino (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)). Estes dados sugerem que a região Fc do anticorpo não é necessária para a inibição do crescimento de tumores e, além disso, a bivalência e funções efetoras mediadas por Fc não são necessárias para atividade biológica *in vivo* ou *in vitro*.

As amostras a seguir expressas por células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) elaboradas de forma recombinante foram analisadas:

Amostra	Processo de Fabrico	Escala
Material de Referência	Fase I	400 L
Lote S9802A	Fase II	2000 L
Materiais de Desenvolvimento de Processos (Conduções Programa de desenvolvimento 1, 2, 3, 5 e 6)	clínico, incluindo Fase III	400 L
Nota: 400 L Condução 4 não disponível devido a contaminação na cultura de inoculado de 100 L no Dia 2.		

ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS N-TERMINAIS

Realizou-se análise de sequências N-terminais utilizando métodos de degradação Edman padrão e os resultados são exibidos no Quadro 2A, Quadro 2B e Quadro 2C para o Material de Referência, Lote S9802A, e o material de desenvolvimento de processos Condução 1 escala 400 L, respetivamente. As sequências N-terminais esperadas (Figura 3A e Figura 3B) das cadeias leve e pesada foram observadas em todas as amostras. Sequência menor adicional correspondente à cadeia leve com três aminoácidos adicionais Val-His-Ser (VHS) antes da sequência N-terminal esperada também foi detetada nas cinco amostras. A sequência VHS é uma parte do péptido de sinal que é removida da proteína à medida que é segregada. Divisão alternativa do péptido de sinal resulta na extensão de VHS no terminal N de pertuzumab. Nos materiais produzidos anteriormente para estudos clínicos de Fase I/II, cerca de 2 % a 4 % das moléculas de pertuzumab contêm uma das duas cadeias leves que contêm a sequência VHS N-terminal. O nível de cadeias leves com sequência VHS N-terminal nestes materiais (1 % a 2 % de cada cadeia leve), entretanto, foi baixo demais para ser detetado na análise de sequências N-terminais. Nas amostras de desenvolvimento de cinco processos, o nível desta espécie de cadeia leve encontra-se levemente acima do limite de deteção da análise N-terminal

em cerca de 4 % a 5 %. Os dados de sequenciamento N-terminais para as amostras de desenvolvimento de cinco processos são consistentes com os resultados cromatográficos de permuta de catiões, que demonstram que as cinco amostras de desenvolvimento de processos contêm cerca de 9 % das moléculas de pertuzumab, em que uma cadeia leve contém a extensão VHS (veja-se Cromatografia de Permuta de Catiões (CEC) a seguir).

Nenhuma outra sequência foi detetada (limite de detecção estimado em 3 %), o que indica a ausência de locais de divisão interna.

ANÁLISE ESPETROMÉTRICA DE MASSA

As amostras de Pertuzumab foram reduzidas com ditiotreitol e analisadas por meio de espectrometria de massa por eletropulverização - ionização (ESI-MS) utilizando espectrômetro de massa PE SCIEX API 3000® para confirmar que as massas das cadeias leve e pesada são consistentes com as suas sequências esperadas. Os espectros de massa reconstruídos para o Material de Referência, Lote S9802A, e o material de desenvolvimento de processo Condução 1 escala de 400 L são comparados na Figura 8A e na Figura 8B. A massa de cadeia leve observada (23.524 Da) é consistente com o valor previsto a partir da sua sequência para todos os três materiais. Dois picos menores adicionais em 23.685 Da e 23.847 Da (161 e 323 Da mais altos que a massa de cadeia leve, respetivamente) foram observados. O primeiro pico (23.685 Da) é propenso a surgir da glicação na cadeia leve. O segundo pico (23.847 Da) é observado mais claramente nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L. Este pico é presumivelmente da cadeia leve com a extensão Val-His-Ser (veja-se a Análise de Sequências N-Terminais acima e a Análise Cromatográfica de Permuta de Catiões) ou a cadeia leve com dois locais de glicação.

Várias massas correspondentes a diferentes formas da cadeia pesada foram observadas. A substância predominante da cadeia pesada possui massa de 50.532 Da, decorrente da cadeia pesada que consiste em resíduos 1 a 448 com uma estrutura de oligossacárido G0. Outras formas observadas incluem a cadeia pesada que contém resíduos 1 a 448 com uma estrutura de oligossacáridos G1 ou G2 (Figura 8B).

HETEROGENEIDADE DE CARGA POR CROMATOGRAFIA DE PERMUTA DE CATIONES E ELETROFORESE DE ZONA CAPILAR

Utilizou-se cromatografia de permuta de cationes (CEC) para determinar a heterogeneidade de carga em Pertuzumab. Amostras, antes e depois do tratamento com carboxipeptidase B (CPB), foram analisadas com coluna de permuta de cationes DIONEX™ (PROPAC WCX-10™, 4 mm x 250 mm), utilizando 20 mM de tampão MES, pH 6,0, e gradiente de NaCl raso. A comparação de cromatogramas é exibida na Figura 9A (antes do tratamento com CPB) e na Figura 9B (após tratamento com CPB). Diversos picos foram observados em todos os três lotes. Para fins de caracterização, os cromatogramas são divididos em seis regiões (marcadas A até F na Figura 9A e 9B). As áreas de pico relativas para as seis regiões encontram-se relacionadas no Quadro 3A e no Quadro 3B. A quantidade de variante ácida (na região A) é mais alta no Lote S9802A e nos materiais de desenvolvimento de processos de escala 400 L que no Material de Referência. As variantes básicas na região C e D, que se demonstrou conterem Pertuzumab com resíduo de lisina C-terminal sobre uma (região C) ou as duas (região D) cadeias pesadas, são reduzidas no Lote S9802A e nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L em comparação com o Material de Referência. Após o tratamento com CPB, as moléculas com Pertuzumab com lisina C-terminal com uma ou duas cadeias pesadas foram convertidas em espécie principal na região B

e não mais detetadas na região C e D. Apenas pico pequeno, cuja identidade ainda não foi determinada, permaneceu na região C após tratamento com CPB. A variante básica na região E, que se demonstrou surgir a partir das moléculas de Pertuzumab com uma cadeia leve que contém a extensão VHS, é mais alta nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L (9 % - 10 %) que no Material de Referência e no Lote S9802A (4 %). Demonstrou-se que a variante básica na região F é Pertuzumab que contém extensão VHS N-terminal sobre uma cadeia leve e lisina C-terminal sobre uma cadeia pesada. Como resultado de níveis mais altos de variantes ácidas e básicas, a espécie principal na região B é mais baixa nos materiais de desenvolvimento de processos de escala 400 L que no Material de Referência ou no Lote S9802A.

Além da cromatografia de permuta de catiões, empregou-se eletroforese de zona capilar (CZE) para examinar a heterogeneidade de carga em Pertuzumab. Os picos de CZE foram identificados e correlacionados com os picos observados em análise de CEC, por meio de análise de frações de CEC recolhidas individualmente com CZE. As quantidades relativas de variantes de carga determinadas por CZE e CEC são comparáveis para todos os materiais analisados.

As atividades biológicas de variantes de carga de Pertuzumab em diferentes frações de CEC aparentemente são as mesmas com base em ensaio de antiproliferação com base em células. Desta forma, não se espera que a heterogeneidade de carga em Pertuzumab afete a sua potência. As atividades biológicas dos materiais de desenvolvimento de processo de 400 L são comparáveis com as do Material de Referência e Lote S9802A (veja-se Atividade Biológica e Quadro 4).

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Utilizou-se cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) para determinar a extensão da agregação em Pertuzumab. Amostras foram analisadas em coluna TOSOHAAS TSK G3000SWXL™ (7,8 mm x 300 mm). Utilizou-se eluição isocrática (100 mM de fosfato de potássio, pH 6,8, 0,5 ml/minuto) com absorção ultravioleta (UV) monitorizada a 280 nm. Os dados de SEC para o Material de Referência, Lote S9802A e o material de desenvolvimento de processo escala 400 L Condução 1 são exibidos na Fig. 10. O monômero encontra-se consistentemente em mais de 99,6 % por área de pico e o agregado encontra-se abaixo de 0,3 % em todos os materiais analisados.

ANÁLISE DE CE-SDS-LIF

Análise de eletroforese capilar-dodecil sulfato de sódio com fluorescência induzida por laser (CE-SDS-LIF) também foi utilizada para determinar a pureza de amostras de Pertuzumab. Eletroferogramas similares foram observados para o Material de Referência, Lote S9802A e o material de desenvolvimento de processo escala 400 L Condução 1 com e sem redução (Figs. 11A e 11B). Os níveis de cadeia pesada não glicosilada determinados a partir dos eletroferogramas de materiais reduzidos são de 2,6 % a 4,3 % (com relação à cadeia pesada total). As quantidades de agregados nestas amostras (não reduzidas) determinadas por meio de análise CE-SDS-LIF são consistentes com os resultados de SEC. Nenhuma evidência de fragmentos de produtos significativos ou outras impurezas foi encontrada na análise CE-SDS-LIF dessas amostras. Os dados de CE-SDS-LIF sugerem que o perfil de impurezas dos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L são similares aos do Material de Referência e Lote S9802A.

ANÁLISE DE SDS-PAGE

A análise de eletroforese SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (4 % - 20 % gel T (Daichi Pure Chemicals Co., Tóquio, Japão) com manchas de SYPRORUBY™) foi realizada para comparar as amostras reduzidas e intatas do Material de Referência, Lote S9802A, e os materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L. Nenhuma faixa nova foi observada nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L, o que novamente indica que o perfil geral de impurezas nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L são similares ao Material de Referência e Lote S9802A.

ANÁLISES DE MAPAS DE PÉPTIDOS TRÍPTICOS E LYS-C

Foram realizadas análises de mapas de péptidos trípticos e Lys- C para examinar e comparar a estrutura primária de Pertuzumab no Material de Referência, Lote S9802A e nos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L. Parcelas de Pertuzumab reduzido e S-carboximetilado foram digeridas com tripsina e parcelas de Pertuzumab reduzido e sulfitolizado foram digeridas com endoproteinase Lys-C. O digerido de tripsina foi separado por meio de cromatografia de fase reversa utilizando coluna VYDAC C-18™ (4,6 mm x 250 mm) com gradiente de 0 % a 60 % de acetonitrilo. A absorção foi monitorizada a 214 nm e as massas de péptidos foram determinadas por meio de ESI-MS utilizando THERMO FINNIGAN LCQ™. O digerido de Lys-C foi separado por meio de cromatografia de fase reversa utilizando coluna ZORBAX C-8™ (4,6 mm x 150 mm) com gradiente de álcool isopropílico a 0 %-100 %. A absorção foi monitorizada a 214 nm e as massas de péptidos foram determinadas por meio de ESI-MS utilizando THERMO FINNIGAN LCQ™.

Os mapas de péptidos trípticos e Lys-C para o Material de Referência, Lote S9802A, e o material de desenvolvimento de processo escala 400 L Condução 1 são comparados na Figura 12A e na Figura 12B, respectivamente. Os mapas trípticos e Lys-C para todos os três materiais são essencialmente idênticos. A maior parte dos péptidos foi identificada por meio de LC-MS e coincidiu com massa de péptido esperada. Os péptidos trípticos observados identificaram 97,1 % (436/449) dos resíduos de cadeia pesada e 95,8 % (205/214) dos resíduos de cadeia leve. A cobertura de sequências é de 98,4 % (442/449) e 70,6 % (151/214) para as cadeias pesada e leve, respectivamente, no mapa de Lys-C. Descobriu-se que o péptido N-terminal que contém a extensão VHS coeluiu com o péptido N-terminal sem a extensão VHS no mapa de péptidos trípticos por LC-MS. Nenhuma quantidade significativa de péptidos oxidados ou desamidados foi detectada nos mapas de péptidos.

ATIVIDADE BIOLÓGICA

A atividade biológica de Pertuzumab foi determinada medindo-se a sua capacidade de inibir a proliferação da linha de cancro de mama humano MDA-MB-175-VII. O percentual de atividades específicas obtido para cinco amostras de desenvolvimento de processo escala 400 L (Quadro 4) encontra-se no intervalo de 90 % a 96 % e é similar às atividades para o Material de Referência (100 % por definição) e Lote S9802A (98 % relatado no Certificado de Análise). Conforme esperado, a heterogeneidade de carga não afeta a potência de Pertuzumab. Todos os materiais possuem atividades antiproliferativas comparáveis.

ANÁLISE DE OLIGOSSACÁRIDOS N-LIGADOS

Parte da heterogeneidade de massa na cadeia pesada

surge da glicosilação em Asn-299. Para determinar a heterogeneidade dos oligossacáridos, amostras de Pertuzumab foram digeridas durante a noite com PNGase F para liberar os glicanos N-ligados. Os oligossacáridos libertados foram derivados em seguida com o fluoróforo 9-amino-1,4,6-trissulfonato (APTS). Formas de glicano individuais foram separadas por meio de eletroforese capilar (CE) (Beckman P/ACE 5500 CE equipado com capilar revestido Beckman) e quantificadas com detecção de fluorescência.

Os eletroferogramas da análise CE dos oligossacáridos neutros libertados do Material de Referência, Lote S9802A, e do material de desenvolvimento de processo Condução 1 escala de 400 L são exibidos na Figura 13. Para referência, as estruturas de oligossacáridos comumente encontradas em anticorpos IgG1 humanos e resumo da nomenclatura utilizada são incluídos na Figura 14A e 14B. As quantidades relativas de oligossacáridos em todos os materiais encontram-se resumidas no Quadro 5.

Os oligossacáridos com estruturas G0 e G1 são os glicanos predominantes. Picos decorrentes de outras estruturas de oligossacáridos também foram observados nos eletroferogramas. Estas estruturas incluem glicoformas G2, GO-F, G-1, Man5 e G1-1 (ou Man6). Além disso, as isoformas são resolvidas. As distribuições de glicanos observados são similares em todos os materiais (Quadro 5). Entretanto, em comparação com os Materiais de Referência e os materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L, o material de Fase II (Lote S9802A) contém quantidade menor de glicanos com uma estrutura G0 e mais glicanos com uma estrutura G1. Apesar das diferenças na distribuição de glicanos, todos os materiais possuem atividades biológicas similares. Além disso, a alteração da heterogeneidade de glicanos não apresentou impacto significativo sobre a afinidade de ligação a Pertuzumab para FcRn (Quadro 6) ou recetores Fc gama (Quadro 7) (veja-se Ensaios de Ligação a Recetor FcRn

e Recetor Fc Gama).

Os oligossacáridos neutros libertados também foram analisados por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF (MALDI-TOF/MS). Os espectros MALDI-TOF para os oligossacáridos neutros libertados do Material de Referência, Lote S9802A, e o material de desenvolvimento de processo Condução 1 escala de 400 L são comparados na Figura 15. A estrutura e distribuição de glicanos obtida por meio de análise MALDI-TOF/MS são consistentes com os resultados de CE.

ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO ISOELÉTRICA DE CAPILARES

Utilizou-se concentração isoelétrica de capilares (cIEF) para determinar o pI de Pertuzumab no Material de Referência, Lote S9802A e no material de desenvolvimento de processo Condução 1 de escala 400 L. Embora as quantidades relativas das diferentes substâncias carregadas nestes materiais fossem um tanto diferentes conforme observado na análise CEC, concluiu-se que o pI da espécie principal era de 8,7 em todas as amostras.

ANÁLISE DE SULFIDRILO LIVRE

O Material de Referência, Lote S9802A e os materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L foram testados para determinação do tiol livre (resíduo de cisteína não emparelhado) utilizando a análise de Ellman. O nível de tiol livre estava abaixo do limite de detecção (cerca de 0,05 mol de tiol livre por mol de proteína) em todos os materiais testados.

ENSAIO DE LIGAÇÃO A RECETOR FcRn

As afinidades de ligação a recetor FcRn de Pertuzumab

do Material de Referência, Lote S9802A e dos materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L foram comparadas utilizando ensaio ELISA similar ao descrito em Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001). O Material de Referência foi utilizado como padrão neste ensaio.

Placas de microtítulos com 96 poços MAXISORP™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidas em primeiro lugar com NEUTRAVADIN™ (Pierce, Rockford IL) a 4 °C durante a noite. FcRn humano biotinilado foi adicionado em seguida às placas a 2 µg/ml e incubado durante uma hora. Onze diluições seriais por duas vezes de amostras de Pertuzumab (3,1 a 3200 ng/ml) foram adicionadas às placas e incubadas por duas horas. Pertuzumab unido foi detetado por meio da adição de F(ab')₂ anti-IgG humano F(ab')₂ de cabra marcado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) e utilizando 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg MD) como substrato. A absorção foi lida a 450 nm em leitor TITERTEK MULTISKAN™ (MCC/340) (ICN, Costa Mesa CA). A afinidade de ligação a FcRn de Pertuzumab também foi avaliada em segundo formato ELISA no qual HER2-ECD foi revestido sobre placas. Amostras de Pertuzumab diluídas em série foram adicionadas às placas e incubadas por duas horas. As placas foram lavadas e foram adicionados 2 mg/ml de FcRn humano biotinilado. FcRn unido foi detetado utilizando estreptavidina-HRP com TMB como substrato.

Foram determinadas a absorção no ponto intermediário da curva de titulação (mid-OD) do padrão (isto é, Material de Referência) e as concentrações correspondentes do padrão e amostras neste OD intermediário. A atividade de ligação relativa foi calculada por meio da divisão da concentração de OD intermediária de padrão pela da amostra.

As afinidades de ligação a FcRn relativas obtidas dos dois formatos de ELISA encontram-se relacionadas no Quadro

6. Dados dos dois formatos de ELISA diferentes são comparáveis. Embora as distribuições de glicano em diferentes materiais de Pertuzumab não sejam idênticas, as afinidades de ligação a FcRn desses materiais são comparáveis, o que indica que a heterogeneidade de glicano em Pertuzumab não possui efeito aparente sobre a sua afinidade de ligação a FcRn.

ENSAIO DE LIGAÇÃO A RECETOR Fc GAMA

A ligação a Pertuzumab aos recetores Fc gama (FcγR) humanos foi determinada por meio de ensaio ELISA de acordo com Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001) com modificações.

IgG monomérico pode ligar-se ao FcγRIa de alta afinidade (CD64); entretanto, os recetores de baixa afinidade (FcγRIIa (CD32A), FcγRIIb (CD32B) e FcγRIIIa (CD16)) exigem IgG multimérico para ligação significativa. Portanto, para os testes de ligação a recetor de baixa afinidade, multímeros de Pertuzumab foram formados antes do teste por meio da mistura de cada amostra (200 mg/ml) com cadeia anti-capa humano de cabra (400 mg/ml; ICN Biomedical, Irvine CA). FcγR humano foi expresso na forma de proteína de fusão recombinante do domínio extracelular das cadeias alfa recetoras com Gly/His6/GST (glicina/6 histidinas/glutathione-s-transferase). Placas de teste bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) e revestidas com anti-GST foram utilizadas para capturar FcγR. Os recetores (100 μl a 0,25 mg/ml) foram adicionados às placas e incubados durante uma hora. Diluições em série de amostras de Pertuzumab (100 μl) foram adicionadas na forma de monómeros para FcγRIa e como multímeros para FcγR de baixa afinidade e as placas foram incubadas por duas horas. O Pertuzumab unido foi detectado por meio da adição de anti-F(ab')₂ humano de cabra conjugado com peroxidase de

rabanete silvestre (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove PA) e utilizando TMB como substrato. Os valores EC_{50} para ligação a Pertuzumab ao Fc γ R foram determinados por meio de análise de regressão não linear com modelo de quatro parâmetros (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading PA). RITUXAN[®] (Lote C2B81298-2) foi utilizado como anticorpo de controle.

Os valores EC_{50} para ligação a Pertuzumab a Fc γ R encontram-se resumidos no Quadro 7. Os resultados demonstram que o Material de Referência, Lote S9802A, e os materiais de desenvolvimento de processo de escala 400 L possuem afinidades de ligação comparáveis para Fc γ R. Estes resultados sugerem que a heterogeneidade de glicano em Pertuzumab não apresenta efeitos significativos sobre as suas afinidades de ligação a Fc γ R.

Quadro 2A

Análise de Sequência N-Terminal de Material de Referência de Pertuzumab (nmol de resíduo observado em cada ciclo)												
Resíduo	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,05	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	0,11
ARG	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06
ASN	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,06	0,07
ASP	<u>0,48</u>	0,08	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0,00	0,01	<u>0,92</u>	0,13	0,04	<u>0,46</u>	0,13	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09
GLU	0,49	0,05	0,13	0,03	0,03	0,51	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
GLY	0,01	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,30	0,35	0,36	0,13	0,09
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
ILE	0,00	<u>0,48</u>	0,06	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
LEU	0,00	0,03	0,04	0,43	0,11	0,08	0,09	0,11	0,12	0,13	<u>0,62</u>	0,26
LYS	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,00	0,12
MET	0,00	0,00	0,00	0,53	0,07	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
PHE	0,00	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08
PRO	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,04	0,05	<u>0,32</u>	0,13	0,09	0,09	0,10
SER	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	<u>0,56</u>	0,16	<u>0,30</u>	<u>0,33</u>	0,18	<u>0,28</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,04	<u>0,33</u>	0,12	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10	0,10
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
TYR	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11	0,13
VAL	0,01	0,51	0,08	0,10	0,53	0,15	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,51
Cadeia Leve	<u>QSP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadeia Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Nota: São proporcionados os nanomoles de resíduos de aminoácidos de fenil-tio-hidantoína observados em cada ciclo. Os resíduos da cadeia pesada são proporcionados em negrito e os resíduos da cadeia leve são sublinhados. Cerca de 0,5 nmol de proteína foram carregados, equivalentes a 1,0 nmol de cada uma das cadeias leve e pesada. Cisteína (CYS) não é observada na análise de sequências.

Quadro 2B

Análise de Sequência N-Terminal de Pertuzumab Lote S9802A (nmol de resíduo observado em cada ciclo)												
Resíduo	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,06	0,08	0,09	0,11	0,12	0,14	0,14
ARG	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08
ASN	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
ASP	<u>0,61</u>	0,12	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	0,11	0,13
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0,00	0,01	<u>1,11</u>	0,22	0,06	<u>0,55</u>	0,19	0,10	0,11	0,11	0,11	0,12
GLU	0,61	0,09	0,15	0,05	0,04	0,61	0,19	0,10	0,09	0,10	0,10	0,11
GLY	0,01	0,01	0,04	0,04	0,06	0,06	0,07	0,37	0,44	0,46	0,19	0,13
HIS	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
ILE	0,00	<u>0,56</u>	0,10	0,02	0,04	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06
LEU	0,00	0,04	0,05	0,51	0,17	0,11	0,12	0,14	0,15	0,17	<u>0,76</u>	0,37
LYS	0,00	0,00	0,04	0,00	0,06	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,00	0,16
MET	0,00	0,00	0,01	<u>0,61</u>	0,12	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
PHE	0,00	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09	0,10
PRO	0,00	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	<u>0,37</u>	0,18	0,12	0,12	0,13
SER	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,08	<u>0,63</u>	0,24	<u>0,36</u>	<u>0,41</u>	0,24	<u>0,35</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,05	<u>0,39</u>	0,17	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
TYR	0,16	0,07	0,05	0,06	0,07	0,08	0,10	0,10	0,12	0,13	0,14	0,16
VAL	0,02	0,58	0,13	0,12	0,62	0,22	0,15	0,16	0,18	0,20	0,21	0,62
Cadeia Leve	<u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadeia Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Nota: São proporcionados os nanomoles de resíduos de aminoácidos de fenil-tiohidantoína observados em cada ciclo. Os resíduos da cadeia pesada são proporcionados em negrito e os resíduos da cadeia leve são sublinhadas. Cerca de 0,5 nmol de proteína foram carregados, equivalentes a 1,0 nmol de cada uma das cadeias leve e pesada. Cisteína (CYS) não é observada na análise de sequências.

Quadro 2C

Análise de Sequência N-Terminal de Pertuzumab Condução 1 de Escala de 1400 L (nmol de resíduo observado em cada ciclo)												
Resíduo	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14	0,14
ARG	0,03	0,05	0,07	0,09	0,17	0,15	0,20	0,23	0,24	0,29	0,30	0,33
ASN	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09
ASP	<u>0,89</u>	0,08	0,05	<u>0,11</u>	0,08	0,09	0,11	0,15	0,14	0,16	0,18	0,19
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0,00	0,01	<u>1,17</u>	0,11	0,05	<u>0,60</u>	0,12	0,09	<u>0,14</u>	0,12	0,11	0,12
GLU	<u>0,68</u>	0,05	0,19	0,04	0,04	0,62	0,15	0,10	0,10	0,11	0,11	0,12
GLY	0,01	0,01	0,05	0,04	0,08	0,07	0,07	0,37	0,42	0,44	0,16	0,13
HIS	0,00	<u>0,02</u>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
ILE	0,00	<u>0,56</u>	0,03	0,02	<u>0,07</u>	0,04	0,03	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06
LEU	0,00	0,04	0,05	0,51	0,15	0,12	0,13	0,15	0,16	0,18	0,79	0,31
LYS	0,00	0,00	0,04	0,05	0,08	0,09	0,10	0,12	0,14	0,15	0,17	0,19
MET	0,00	0,00	0,01	<u>0,65</u>	0,04	0,02	<u>0,05</u>	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
PHE	0,00	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05	0,07	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11
PRO	0,00	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	<u>0,41</u>	0,14	0,11	<u>0,13</u>	0,14
SER	0,01	0,02	<u>0,07</u>	0,06	0,08	0,10	0,76	0,21	<u>0,43</u>	<u>0,48</u>	0,23	<u>0,42</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,06	<u>0,57</u>	0,18	0,12	<u>0,16</u>	0,16	0,17	0,18	0,19
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
TYR	0,00	0,02	0,04	0,06	0,07	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14	0,15	0,17
VAL	<u>0,04</u>	0,56	0,10	0,13	0,62	0,19	0,15	0,17	0,19	0,21	0,22	0,62
Cadeia Leve	<u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadeia Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL
VHS-Cadeia Leve	VAL	HIS	SER	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER

Nota: São proporcionados os nanomoles de resíduos de aminoácidos de fenil-tio-hidantoína observados em cada ciclo. Os resíduos da cadeia pesada são proporcionados em negrito e os resíduos da cadeia leve são sublinhadas. Cerca de 0,5 nmol de proteína foram carregados, equivalentes a 1,0 nmol de cada uma das cadeias leve e pesada. Cisteína (CYS) não é observada na análise de sequências.

Quadro 3A

Análise Cromatográfica de Permuta de Catiões de Pertuzumab Nativo (% de área de pico)						
Amostra	Pico de Variante de Permuta de iões					
	A	B	C	D	E	F
Material de referência	10	73	10	3	3	0,4
S9802A	20	68	5	2	4	0,2
Escala 400 L	16	65	5	2	10	0,9
Condução 1						
Escala 400 L	15	67	5	2	9	0,6
Condução 2						
Escala 400 L	15	67	6	2	10	0,6
Condução 3						
Escala 400 L	15	67	5	2	9	0,5
Condução 5						
Escala 400 L	13	63	9	3	9	0,6
Condução 6						
Nota: 400 L Condução 4 não disponível devido à contaminação do inoculado de 100 L no Dia 2.						

Quadro 3B

Análise Cromatográfica de Permuta de Catiões de Pertuzumab Digerido por CPB (% de área de pico)						
Amostra	Pico de Variante de Permuta de iões					
	A	B	C	D	E	F
Material de referência	11	78	4	ND	4	ND
S9802A	20	71	3	ND	4	ND
Escala 400 L	17	68	3	ND	10	ND
Condução 1						
Escala 400 L	15	71	3	ND	9	ND
Condução 2						
Escala 400 L	15	71	3	ND	10	ND
Condução 3						
Escala 400 L	17	70	3	ND	9	ND
Condução 5						
Escala 400 L	16	71	3	ND	9	ND
Condução 6						
Nota: Frações A até F são definidas na Figura 9B. Todos os valores são arredondados até dois algarismos significativos. Os totais de qualquer fileira podem não somar 100 % devido ao arredondamento. 400 L Condução 4 não disponível devido à contaminação do inoculado de 100 L no Dia 2. ND = Não detetado ou não pode ser integrado.						

Quadro 4

Atividades Específicas de Pertuzumab por um Ensaio de Anti-Proliferação Com Base em Células		
Material	Atividade Específica (%)	%CV
Material de referência	100 ^a	–
S9802A	98 ^b	10
Escala 400 L Condução 1	96 ^c	18
Escala 400 L Condução 2	90 ^c	11
Escala 400 L Condução 3	96 ^c	17
Escala 400 L Condução 5	96 ^c	3
Escala 400 L Condução 6	95 ^c	3
Nota: 400 L Condução 4 não disponível devido a contaminação da cultura de inoculado 100 L no Dia 2.		
^a Por definição, a atividade específica do Material de Referência é 100 %.		
^b Valor relatado para o Lote S9802A.		
^c Valor representa a média de três ensaios.		

Quadro 5

Distribuição de Estruturas de Oligossacáridos em Pertuzumab Determinadas por CE							
Amostra	%G0-F	%G-1	%Man5	%G0	%Man6 + %G1-1	%G1 ^a	%G2
Material de referência	1	4	1	71	2	19	2
S9802A	1	4	1	62	2	27	3
Escala 400 L Condução 1	2	6	1	73	3	15	2
Escala 400 L Condução 2	1	6	1	77	2	13	1
Escala 400 L Condução 3	2	6	1	74	4	14	1
Escala 400 L Condução 5	1	5	1	71	2	18	1
Escala 400 L Condução 6	1	5	1	71	3	18	1
Nota: 400 L Condução 4 não disponível devido a contaminação da cultura de inoculado 100 L no Dia 2.							
^a Soma dos dois isômeros GB1.							

Quadro 6

Afinidades de Ligação relativas de Pertuzumab para FcRn		
Amostra	Afinidade de Ligação Relativa ^a	
	Formato de Revestimento	
	NeutrAvidin	Her2ECD
Material de Referência (Padrão)	1,00	1,00
S9802A	1,34	1,30
Escala 400 L Condução 1	1,04	1,22
Escala 400 L Condução 2	1,09	1,31
Escala 400 L Condução 5	1,22	1,36
Escala 400 L Condução 6	1,06	1,29
Nota: 400 L Condução 4 não disponível devido a contaminação da cultura de inoculado 100 L no Dia 2.		
^a A absorção no ponto intermediário da curva de titulação (OD intermediário) do padrão (isto é, Material de Referência) e das concentrações correspondentes de padrão e amostras neste OD intermediário foi determinada. A afinidade de ligação relativa foi obtida dividindo-se a concentração de OD intermediário de padrão pela da amostra.		

Quadro 7

Valores de EC ₅₀ para Ligação de Pertuzumab a Recetores de Fc Gama										
Amostra	EC ₅₀ (µg/ml)									
	FcγRIa		FcγRIIa		FcγRIIb		FcγRIIIa (F158)		FcγRIIIa (V158)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Material de Referência	0,0081	0,0014	5,8	1,8	57	17	14,0	1,4	1,8	0,1
S9802A	0,0078	0,0020	5,4	1,9	45	17	7,8	0,3	1,1	0,1
Escala 400 L Cond. 1	0,0079	0,0013	5,4	1,5	70	25	8,4	0,9	1,2	0,1
Escala 400 L Cond. 2	0,0074	0,0016	5,8	1,6	54	18	10,4	0,7	1,4	0,2
Escala 400 L Cond. 3	0,0075	0,0015	5,5	1,1	54	10	8,2	0,9	1,2	0,1
Escala 400 L Cond. 5	0,0076	0,0011	6,1	2,7	50	12	10,9	1,5	1,4	0,2
Escala 400 L Cond. 6	0,0080	0,0005	6,2	1,9	44	1	10,3	0,9	1,4	0,2
Nota: A média e o desvio padrão (DP) foram obtidos a partir de conduções múltiplas do teste (N = 4). O recetor de FcγRIIIa possui duas versões: F158 e V158.										
400 L Condução 4 não disponível devido à contaminação da cultura de inoculado de 100 L no Dia 2.										

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 4968603 A [0004]
- WO 9422478 A [0005]
- US 5824311 A [0005]
- US 5677171 A [0006] [0076] [0162]
- US 5821337 A [0007] [0051] [0065] [0132]
- WO 9400136 A [0008]
- US 5783186 A [0008]
- US 5183884 A [0009] [0037]
- US 5480968 A [0009] [0037]
- EP 599274 A [0009] [0038]
- US 5641869 A [0010] [0040]
- WO 0100238 A [0013]
- US 6339142 B [0014]
- WO 9919488 A [0038]
- US 4816567 A [0045] [0046] [0106] [0116] [0118]
- US 5500362 A [0051]
- WO 9316185 A [0062] [0130]
- US 5571894 A [0062] [0130]
- US 5587458 A [0062] [0130]
- EP 404097 A [0063]
- WO 9311161 A [0063]
- WO 9321319 A [0065]
- WO 0100245 A, Adams [0070] [0071] [0121] [0157]
[0159] [0161]
- WO 9845479 A [0085]

- US 4933294 A [0085]
- WO 9105264 A [0085]
- US 5401638 A [0085]
- US 4943533 A, Mendelsohn [0091]
- WO 9640210 A [0091]
- US 5212290 A [0091]
- US 5891996 A [0091]
- WO 9850433 A [0091]
- US 6235883 B [0091]
- EP 659439 A2 [0091]
- US 5616582 A [0091]
- US 5457105 A [0091]
- US 5475001 A [0091]
- US 5654307 A [0091]
- US 5679683 A [0091]
- US 6084095 A [0091]
- US 6265410 B [0091]
- US 6455534 B [0091]
- US 6521620 B [0091]
- US 6596726 B [0091]
- US 6713484 B [0091]
- US 5770599 A [0091]
- US 6140332 A [0091]
- US 5866572 A [0091]
- US 6399602 B [0091]
- US 6344459 B [0091]
- US 6602863 B [0091]
- US 6391874 B [0091]
- US 6344455 B [0091]
- US 5760041 A [0091]
- US 6002008 A [0091]
- US 5747498 A [0091]
- WO 9814451 A, PCT [0091]
- WO 9850038 A [0091]
- WO 9909016 A [0091] [0092]

- WO 9924037 A [0091]
- US 5804396 A [0092]
- WO 9843960 A [0092]
- WO 9738983 A [0092]
- WO 9906378 A [0092]
- WO 9906396 A [0092]
- WO 9630347 A [0092]
- WO 9633978 A [0092]
- WO 963397 A [0092]
- WO 9633980 A [0092]
- US 20050101617 A [0092]
- US 5591669 A [0126]
- US 5589369 A [0126]
- US 5545807 A [0126]
- US 5565332 A [0127]
- US 5573905 A [0127]
- US 5567610 A [0128]
- US 5229275 A [0128]
- US 5772997 A [0129]
- WO 9700271 A [0129]
- US 5641870 A [0130]
- WO 9616673 A [0132]
- US 5837234 A [0132]
- WO 9802463 A [0132]
- WO 9308829 A [0133]
- WO 9404690 A [0135]
- US 5731168 A [0136]
- US 4676980 A [0137]
- WO 9100360 A [0137]
- WO 92200373 A [0137]
- EP 03089 A [0137]
- US 20030157108 A1, Presta, L [0153]
- US 20040093621 A1 [0153]
- WO 03011878 A, Jean-Mairet [0153]
- US 6602684 B, Umana [0153]

- WO 9730087 A, Patel [0153]
- WO 9858964 A, Raju, S. [0153]
- WO 9922764 A, Raju, S. [0153]
- US 5766863 A [0158] [0211]
- WO 9817797 A [0163]
- US 5208020 A [0166]
- US 5714586 A [0168]
- US 5712374 A [0168]
- US 5264586 A [0168]
- US 5773001 A [0168]
- WO 9321232 A [0169]
- WO 9411026 A [0172]
- WO 0042072 A, Presta, L. [0177] [0179]
- WO 9951642 A [0178]
- US 6194551 B1 [0178]
- US 6242195 B1 [0178]
- US 6528624 B1 [0178]
- US 6538124 B, Idusogie [0178]
- US 5739277 A [0179]
- US 20020004587 A1, Miller [0180]
- US 4485045 A [0181]
- US 4544545 A [0181]
- WO 9738731 A [0181]
- US 5013556 A [0181]
- WO 9704801 A [0183]
- US 3773919 A [0186]
- US 20010049105 A [0201]
- US 5891650 A [0211]
- US 5914237 A [0211]
- US 6025145 A [0211]
- US 6287784 B [0211]
- US 20030190689 A [0212]
- WO 200386467 A [0227]

Literatura de não patentes citada na descrição

- **BASELGA ; MENDELSON.** *Pharmac. Ther.*, 1994, vol. 64, 127-154 [0003]
- **MASUI et al.** *Cancer Research*, 1984, vol. 44, 1002-1007 [0003]
- **WU.** *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1897-1905 [0003]
- **SLAMON et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0004]
[0218]
- **SLAMON et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0004]
[0218]
- **KING et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 974 [0004]
- **YOKOTA et al.** *Lancet*, 1986, vol. 1, 765-767 [0004]
- **FUKUSHIGE.** *Mol Cell Biol*, 1986, vol. 6, 955-958 [0004]
- **GUERIN et al.** *Oncogene Res.*, 1988, vol. 3, 21-31 [0004]
- **COHEN et al.** *Oncogene*, 1989, vol. 4, 81-88 [0004]
- **YONEMURA et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 1034 [0004]
- **BORST et al.** *Gynecol. Oncol.*, 1990, vol. 38, 364 [0004]
- **WEINER et al.** *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 421-425 [0004]
- **KERN et al.** *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 5184 [0004]
- **PARK et al.** *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, 6605 [0004]
- **ZHAU et al.** *Mol. Carcinog.*, 1990, vol. 3, 254-257 [0004]
- **AASLAND et al.** *Br. J. Cancer*, 1988, vol. 57, 358-363 [0004]
- **WILLIAMS et al.** *Pathobiology*, 1991, vol. 59, 46-52 [0004]
- **MCCANN et al.** *Cancer*, 1990, vol. 65, 88-92 [0004]
- **GU et al.** *Cancer Lett.*, 1996, vol. 99, 185-9 [0004]
- **ROSS et al.** *Hum. Pathol.*, 1997, vol. 28, 821-33 [0004]
- **ROSS et al.** *Cancer*, 1997, vol. 79, 2162-70 [0004]

- **SADASIVAN et al.** *J. Urol.*, 1993, vol. 150, 126-31 [0004]
- **DREBIN et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 695-706 [0005]
- **MYERS et al.** *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 198, 277-290 [0005]
- **DREBIN et al.** *Oncogene*, 1988, vol. 2, 273-277 [0005]
- **HUDZIAK et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0006]
- **FENDLY et al.** *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0006]
- **KOTTS et al.** *In Vitro*, 1990, vol. 26 (3), 59A [0006]
- **SARUP et al.** *Growth Regulation*, 1991, vol. 1, 72-82 [0006]
- **SHEPARD et al.** *J. Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11 (3), 117-127 [0006]
- **KUMAR et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11 (2), 979-986 [0006]
- **LEWIS et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0006]
- **PIETRAS et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0006]
- **VITETTA et al.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 5301-5309 [0006]
- **SLIWKOWSKI et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0006] [0011] [0041]
- **SCOTT et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 14300-5 [0006]
- **D'SOUZA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 7202-7206 [0006]
- **LEWIS et al.** *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0006]
- **SCHAEFER et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 1385-1394 [0006] [0010] [0040] [0160]
- **BASELGA et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0007]

- *Food and Drug Administration*, 25 September 1998 [0007]
- **TAGLIABUE et al.** *Int. J. Cancer*, 1991, vol. 47, 933-937 [0008]
- **MCKENZIE et al.** *Oncogene*, 1989, vol. 4, 543-548 [0008]
- **MAIER et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5361-5369 [0008]
- **BACUS et al.** *Molecular Carcinogenesis*, 1990, vol. 3, 350-362 [0008]
- **STANCOVSKI et al.** *PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 8691-8695 [0008] [0102]
- **BACUS et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2580-2589 [0008]
- **XU et al.** *Int. J. Cancer*, 1993, vol. 53, 401-408 [0008]
- **KASPRZYK et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0008]
- **HANCOCK et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4575-4580 [0008]
- **SHAWVER et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 1367-1373 [0008]
- **ARTEAGA et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 3758-3765 [0008]
- **HARWERTH et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15160-15167 [0008]
- **KLAPPER et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 14, 2099-2109 [0008]
- **KRAUS et al.** *PNAS (USA)*, 1989, vol. 86, 9193-9197 [0009] [0037]
- **PLOWMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0009]
- **PLOWMAN et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 473-475 [0009] [0038]
- **EARP et al.** *Breast Cancer Research and Treatment*,

- 1995, vol. 35, 115-132 [0010]
- **GROENEN et al.** *Growth Factors*, 1994, vol. 11, 235-257 [0010]
 - **HOLMES et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 1205-1210 [0010] [0040]
 - **LEMKE, G.** *Molec. & Cell. Neurosci.*, 1996, vol. 7, 247-262 [0010]
 - **LEE et al.** *Pharm. Rev.*, 1995, vol. 47, 51-85 [0010]
 - **CHANG et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 509-512 [0010]
 - **CARRAWAY et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 512-516 [0010] [0039]
 - **ZHANG et al.** *PNAS (USA)*, 1997, vol. 94 (18), 9562-7 [0010]
 - **HARARI et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 2681-89 [0010] [0039]
 - **LEVI et al.** *Journal of Neuroscience*, 1995, vol. 15, 1329-1340 [0011]
 - **MORRISSEY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 1431-1435 [0011]
 - **LEWIS et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0011]
 - **CARRAWAY ; CANTLEY.** *Cell*, 1994, vol. 78, 5-8 [0011]
 - **AGUS et al.** *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, vol. 22, 192 [0012]
 - **VAJDOS et al.** *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 320 (2), 415-8 [0013]
 - **NAHTA et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 2343-2346 [0013]
 - **REID et al.** Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics. *Poster resented at Well Characterized Biotech Pharmaceuticals conference*, January 2003 [0015]
 - **REED et al.** The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method. *Poster presented at the ABC Antibody Production Conference*, February 2002 [0016]

- **ROUSE et al.** *Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development*, 06 January 2004 [0017]
- **JILL PORTER.** *Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals. IBC Meeting*, September 2000 [0018]
- *United States Copyright Office, Washington, DC 20559*, 10 December 1991 [0031]
- **GARRETT et al.** *Mol. Cell*, 2003, vol. 11, 495-505 [0034]
- **CHO et al.** *Nature*, 2003, vol. 421, 756-760 [0034]
- **FRANKLIN et al.** *Cancer Cell*, 2004, vol. 5, 317-328 [0034] [0042] [0070] [0073] [0078] [0164]
- **PLOWMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0034]
- **CARPENTER et al.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 88T-914 [0035]
- **HUMPHREY et al.** *PNAS (USA)*, 1990, vol. 87, 4207-4211 [0035]
- **SEMBA et al.** *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0036]
- **YAMAMOTO et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0036]
- **PLOWMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, 1746-1750 [0038]
- **SAVAGE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, 7612-7621 [0039]
- **MARQUARDT et al.** *Science*, 1984, vol. 223, 1079-1082 [0039]
- **SHOYAB et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 1074-1076 [0039]
- **KIMURA et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 257-260 [0039]
- **COOK et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 2547-2557 [0039]

- **SHING et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 1604-1607 [0039]
- **SASADA et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 190, 1173 [0039]
- **HIGASHIYAMA et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 936-939 [0039]
- **TOYODA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7495-7500 [0039]
- **KOMURASAKI et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 2841-2848 [0039]
- **ZHANG et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 9562-9567 [0039]
- **KANNAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (6), 3330-3335 [0039]
- **MARCHIONNI et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 312-318 [0040]
- **PELES et al.** *Cell*, 1992, vol. 69, 205-216 [0040]
- **FALLS et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 801-815 [0040]
- **HO et al.** *J. Biol Chem.*, 1995, vol. 270, 14523-14532 [0040]
- **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0045] [0106]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0045] [0115] [0127]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0045] [0115] [0127]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0046]
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol*, 1991, vol. 9, 457-92 [0051] [0053]
- **CLYNES et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0051]
- **M. IN DAËRON.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0053]
- **CAPEL et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34

[0053]

- **DE HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0053]
- **GUYER et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0053]
- **KIM et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0053]
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0054]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1991 [0056] [0057] [0121]
- **CHOTHIA ; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0057]
- **PLÜCKTHUN.** The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0062]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0063] [0140]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0064] [0118]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0064]
- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0064]
- **AGUS et al.** *Cancer Cell*, 2002, vol. 2, 127-137 [0070] [0071] [0233]
- **MOLINA et al.** *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 4744-4749 [0072]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI et al.** The Molecular Basis of Cancer. WB Saunders: Philadelphia, 1995, 13 [0075]
- Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0078] [0079] [0164]
- **ED HARLOW ; DAVID LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0080]
- **SIAS et al.** *J. Immunol. Methods*, 1990, vol. 132, 73-80 [0085]

- **AGNEW.** *Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0089]
- **STRAGLIOTTO et al.** *Eur. J. Cancer*, 1996, vol. 32A, 636-640 [0091]
- **JOHNS et al.** *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279 (29), 30375-30384 [0091]
- **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103 [0107]
- **KOZBOR.** *J. Immunol*, 1984, vol. 133, 3001 [0109]
- **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0109]
- **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0111]
- **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1986, 59-103 [0112]
- **SKERRA et al.** *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0114]
- **PLÜCKTHUN.** *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0114]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0115]
- **MARKS et al.** *io/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0115]
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0115]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0116]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0118]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0118]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0119]
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0119]

- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0119]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0119]
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0126]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0126]
- **BRUGGERMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0126]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0127]
- **JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0127]
- **GRIFFITH et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0127]
- **MORIMOTO et al.** *Journal of Biochemical and biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0130]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0130]
- **CARTER et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0130]
- **MILLSTEIN et al.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0133]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0133]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0135]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0139]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0140]
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0140]

- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0141]
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0142]
- **A. L. LEHNINGER.** *Biochemistry.* Worth Publishers, 1975, 73-75 [0145]
- **CHARI et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0167] [0172]
- **HINMAN et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0168]
- **LODE et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0168]
- **VITETTA et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0172]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0175]
- **CARON et al.** *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0176]
- **SHOPES, B.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0176]
- **WOLFF et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0176]
- **STEVENSON et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0176]
- **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0181]
- **HWANG et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0181]
- **MARTIN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0182]
- **GABIZON et al.** *J. National Cancer Inst.*, vol. 81 (19), 1484 [0182]
- **HUNTER et al.** *Biochem. J.*, vol. 320, 847-53 [0192]
- **SELVIN.** *Nat. Struct. Biol.*, 2000, vol. 7, 730-34 [0193]
- **GADELLA ; JOVIN.** *J. Cell Biol.*, 1995, vol. 129, 1543-58 [0194]
- **NAGY et al.** *Cytometry*, 1998, vol. 32, 120-131 [0194]

- **BROCKHOFF et al.** *Cytometry*, 2001, vol. 44, 338-48 [0195]
- **KENWORTHY.** *Methods*, 2001, vol. 24, 289-96 [0196]
- **ZUCK et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 11122-27 [0199]
- **GRAUS-PORTA et al.** *EMBO J.*, 1997, vol. 16, 1647-55 [0208]
- **KLAPPER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 4995-5000 [0208]
- **THOR et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2000, vol. 18 (18), 3230-3239 [0210]
- **SCHER et al.** *Clin. Cancer Research*, 1995, vol. 1, 545-550 [0213]
- **HUDZIAK et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7159-7163 [0218]
- **SHIELDS et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604 [0254] [0258]

Lisboa, 27 de Outubro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição que compreende:

(a) um anticorpo HER2 de espécie principal que se liga ao domínio II de HER2, e compreende uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável proporcionada como SEQ ID NO:3 e uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável proporcionado como SEQ ID NO:4; e

(b) uma variante de anticorpo que compreende o anticorpo HER2 de espécie principal e uma extensão líder amino-terminal que compreende VHS- numa cadeia leve da variante de anticorpo,

em que 5 de % a cerca de 15 % das moléculas de anticorpo na composição compreendem a extensão líder amino-terminal, conforme quantificada pela análise de permuta de catiões.

2. A composição de acordo com a reivindicação 1, em que a extensão líder amino-terminal é em duas cadeias leves da variante de anticorpo.

3. A composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o anticorpo HER2 de espécie principal e a variante de anticorpo são ambos anticorpos intatos.

4. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo HER2 de espécie principal compreende sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada nas SEQ ID N° 15 e 16, respetivamente.

5. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a extensão líder amino-terminal consiste em VHS-.

6. A composição de acordo com a reivindicação 4, que compreende ainda uma segunda variante do anticorpo HER2 de espécie principal, em que a segunda variante do anticorpo HER2 de espécie principal é selecionada a partir do grupo que consiste em:

- (i) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende um resíduo de lisina C-terminal nas duas cadeias pesadas do mesmo,
- (ii) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende Asn-386 e/ou Asn-391 desamidado numa ou duas cadeias pesadas do mesmo, e
- (iii) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende um resíduo de metionina oxidado na Met-254 da SEQ ID NO:16.

7. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, que compreende ainda uma variante de glicosilação do anticorpo HER2 de espécie principal, em que a variante de glicosilação é selecionada a partir do grupo que consiste em (i) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende uma estrutura de oligossacárido G1 ou G2 unida a uma região Fc do mesmo;

- (ii) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende uma fração de hidrato de carbono unida a uma cadeia leve do mesmo;
- (iii) o anticorpo HER2 de espécie principal que compreende uma cadeia pesada não glicosilada; e
- (iv) o anticorpo HER2 de espécie principal com uma estrutura de oligossacárido sialidada unida a uma região Fc do mesmo.

8. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo HER2 de espécie principal se

liga à junção entre domínios I, II e III de HER2.

9. Um anticorpo que compreende:

- (a) uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 23, ou uma variante desamidada e/ou oxidada do mesmo; e
- (b) uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 24, ou uma variante desamidada e/ou oxidada do mesmo.

10. Uma formulação farmacêutica que compreende a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou o anticorpo de acordo com a reivindicação 9 num portador farmaceuticamente aceitável.

11. Uma formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, para utilização num método de tratamento de cancro que expressa HER2 num paciente que compreende administrar a formulação farmacêutica ao paciente numa quantidade eficaz para tratar o cancro.

12. Utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou o anticorpo de acordo com a reivindicação 9, no fabrico de um medicamento para tratar o cancro que expressa HER2.

Lisboa, 27 de Outubro de 2014

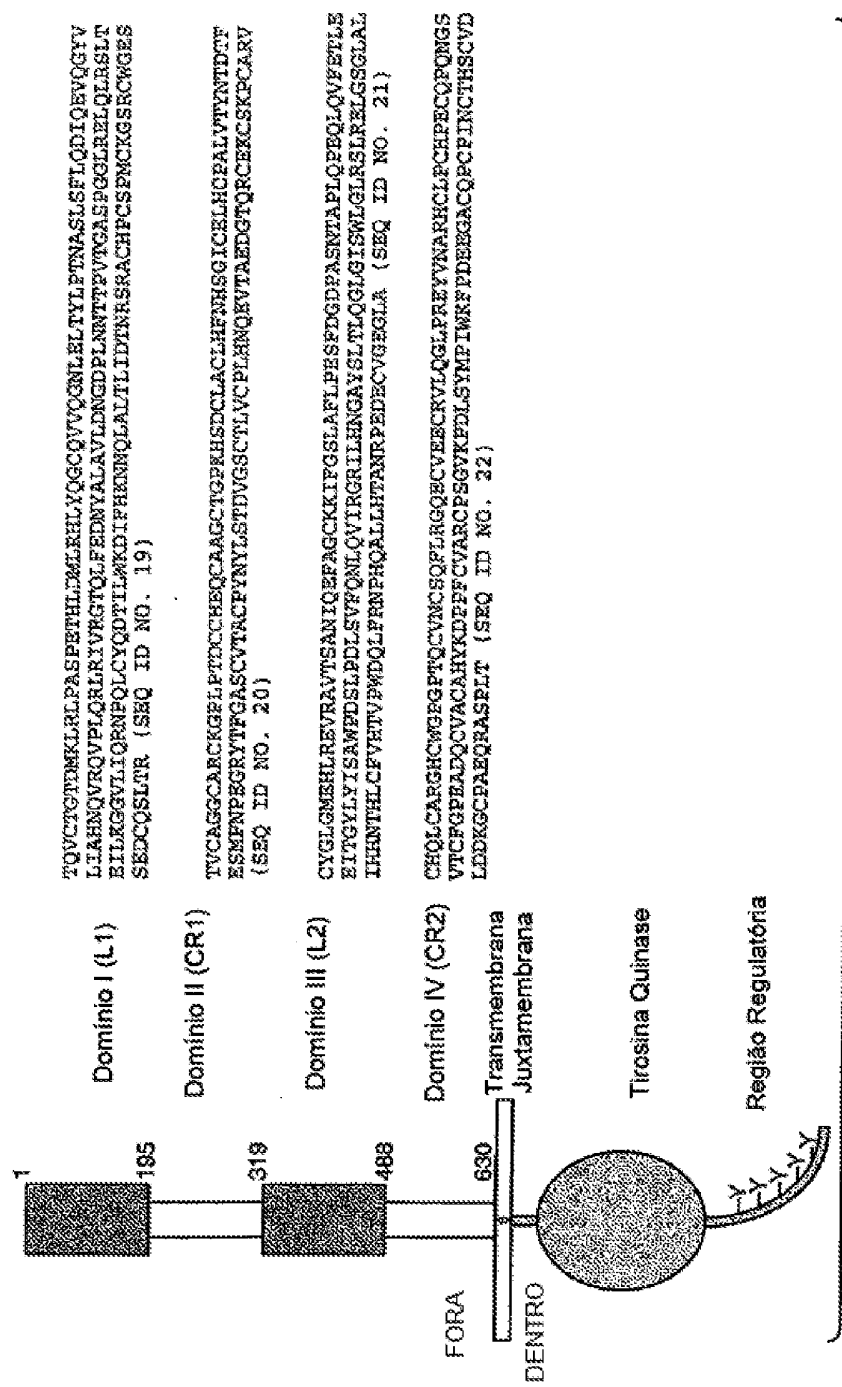


Fig. 1

VARIÁVEL LEVE

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQR	P

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFETISSVQA		
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFETISSVQA		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPDRFTGSGSGTDFETISSVQA		

	90	100
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)
	* *	*
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:3)
	*** *	
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:5)

Fig. 2A

VARIÁVEL PESADA

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSTKISKAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
	** ** *	*		*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** ** *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLNWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDSSSRIVYM		
	* * **	*** *	*****	
574	PGKGLNWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** ** *			
hum III	PGKGLNWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSITFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTLTVSS	(SEQ ID NO:2)
	*** **		**	
574	QMNSLRADTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTLTVSS	(SEQ ID NO:4)

hum III	QMNSLRADTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTLTVSS	(SEQ ID NO:6)

Fig. 2B

Sequência de Aminoácido para Cadeia Leve de Pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIQVAVYQOKPGKAPKLLIYSASRYTGVPS
70      80      90      100     110     120
RPSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYTYITFTFGQGTKVBIKRTVAAPSVFIFPP
130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
190     200     210
LSKADYSEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

Fig. 3A**Sequência de Aminoácido para Cadeia Pesada de Pertuzumab**

```

1      10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKOLEWVADVNPNSSGGSIY
70      80      90      100     110     120
NQRFFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFTFDYWGQGLTVVSSA
130     140     150     160     170     180
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190     200     210     220     230     240
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPFELLOGP
250     260     270     280     290     300
SVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNS
310     320     330     340     350     360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370     380     390     400     410     420
TQNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWEENGQPENNYKTPFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430     440     448
QGNVFPSCSVNHEALNNHYTQKSLSLSPG

```

Fig. 3B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G T D F 90
91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135
136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
226 K S F N R G E C (SEQ ID NO. 17) 233

FIG._4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
 271 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18) 465

FIG._4B

EGFR ativado por ligante heterodimeriza com HER2 2C4 liga-se ao sítio de ligação heterodimérico

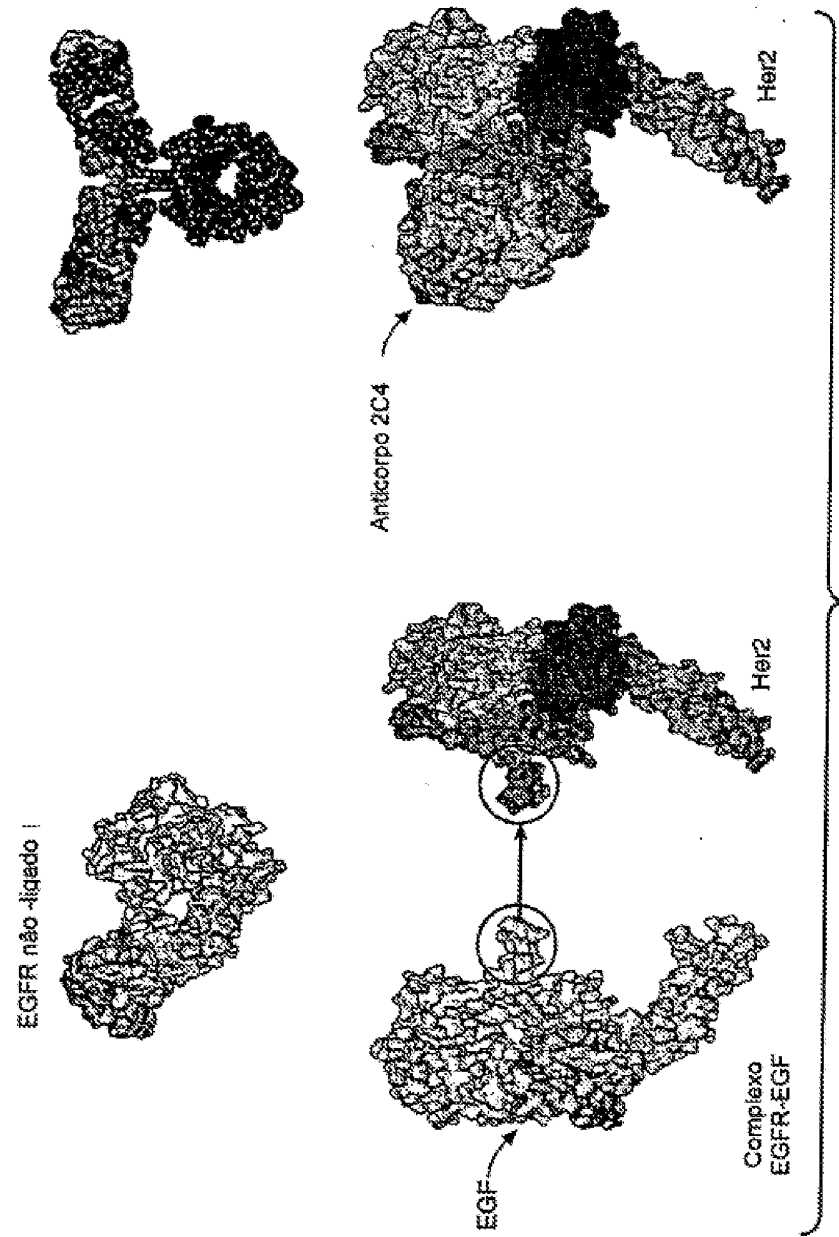


Fig. 5

Acoplamento do HER2/3 ao MAPK e via Akt

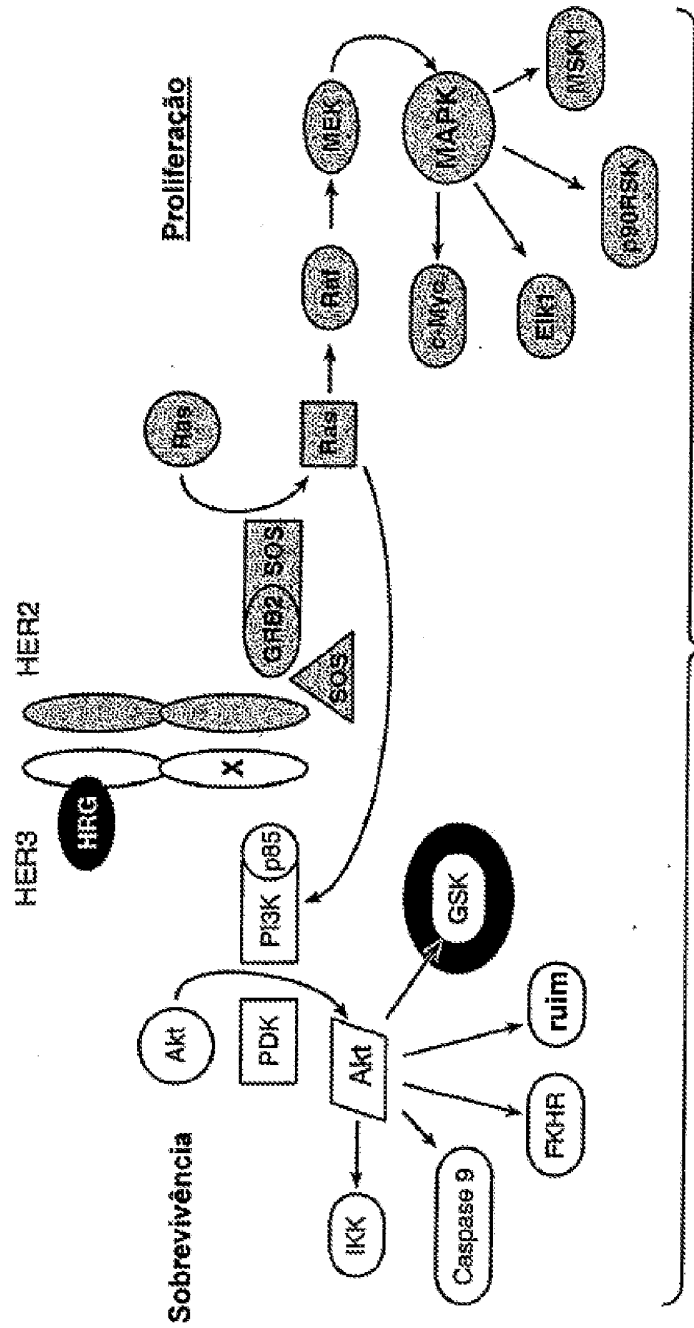
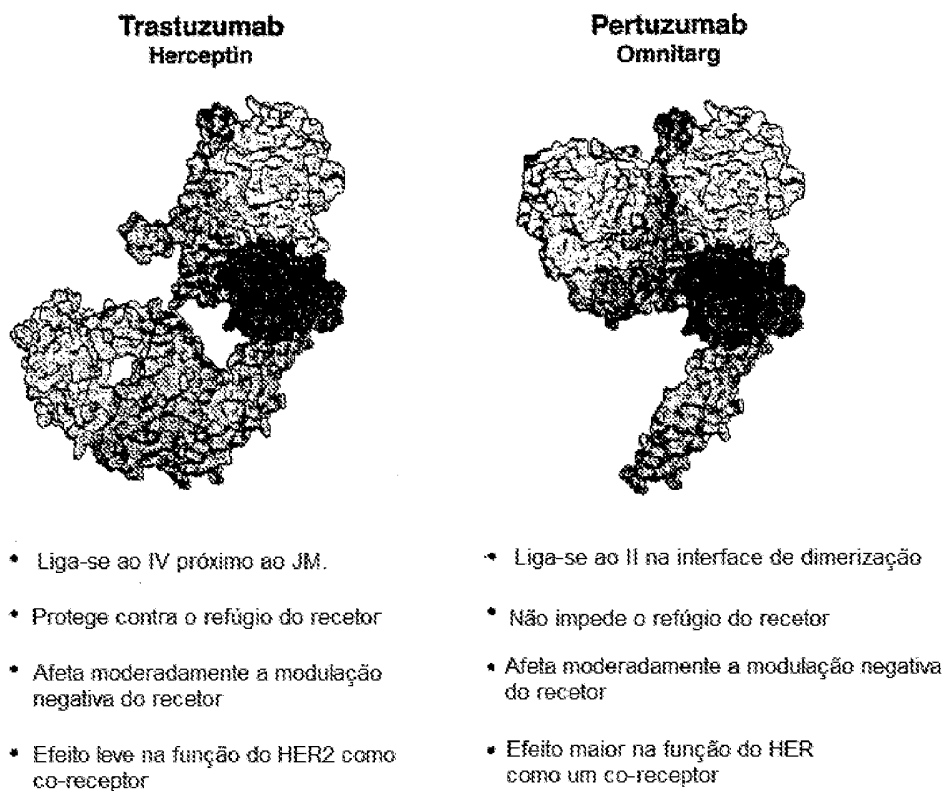


Fig. 6

**FIG._7**

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Leve

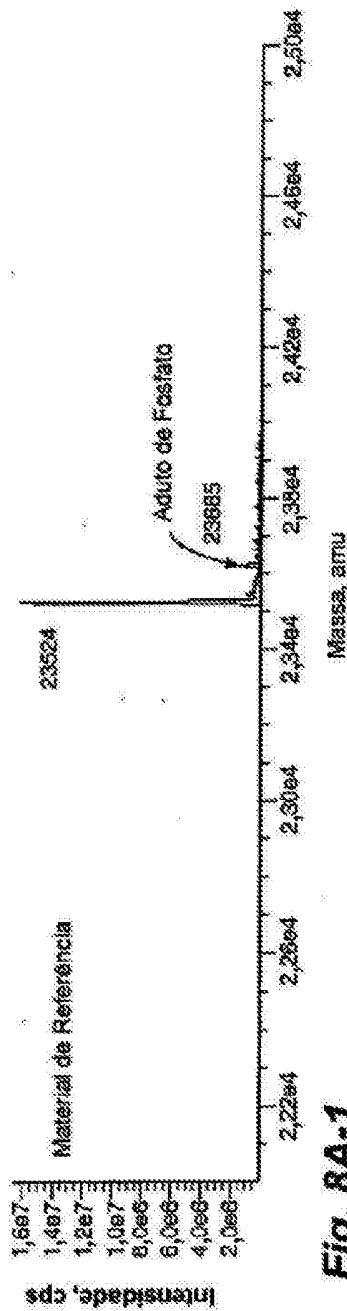


Fig. 8A-1

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Leve

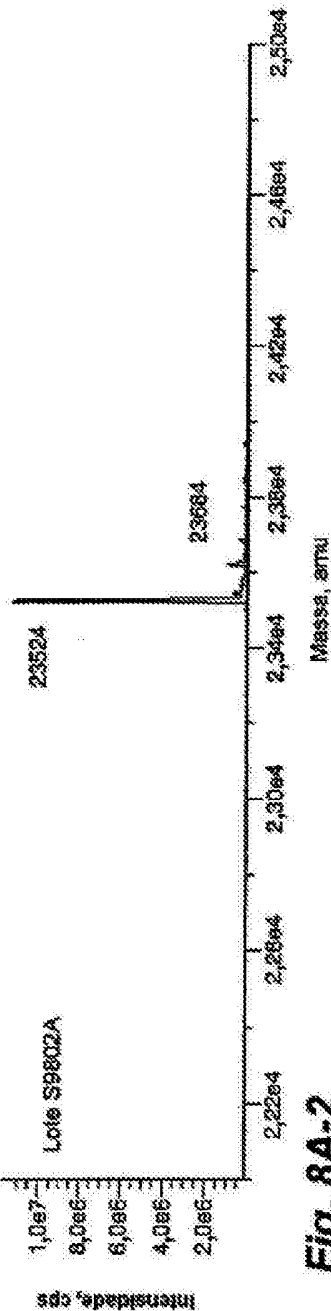


Fig. 8A-2

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Leve

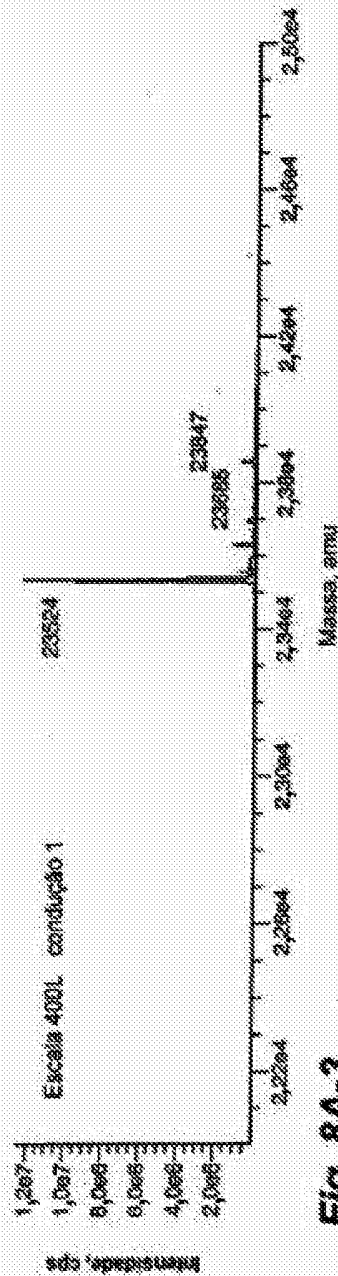


Fig. 8A-3

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Pesada

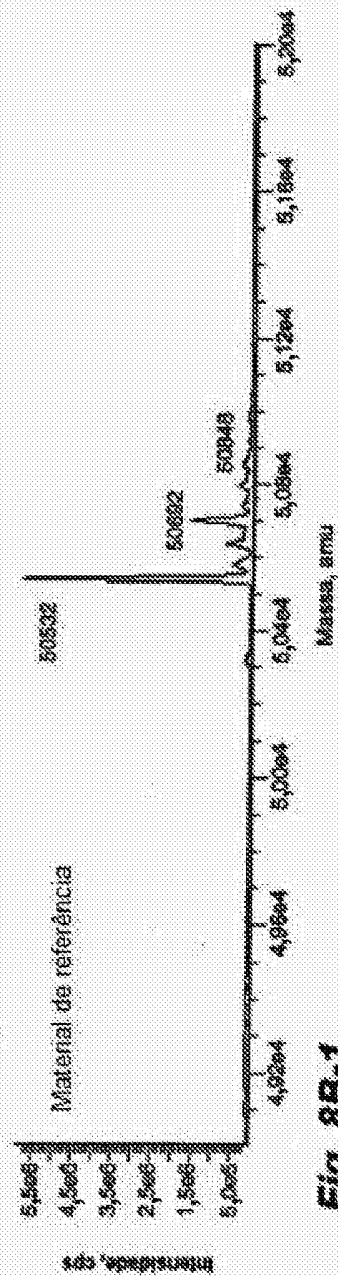


Fig. 8B-1

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Pesada

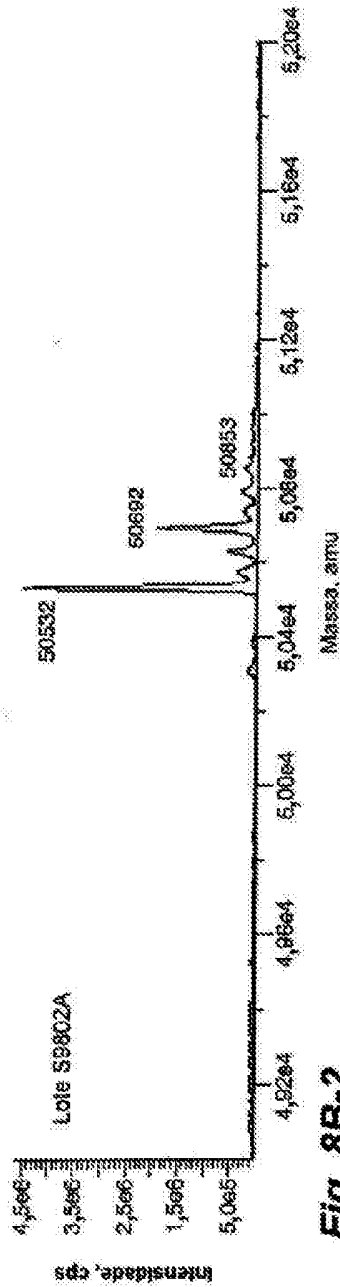


Fig. 8B-2

Espectro de Massa Reconstruída de Pertuzumab Reduzido: Cadeia Pesada

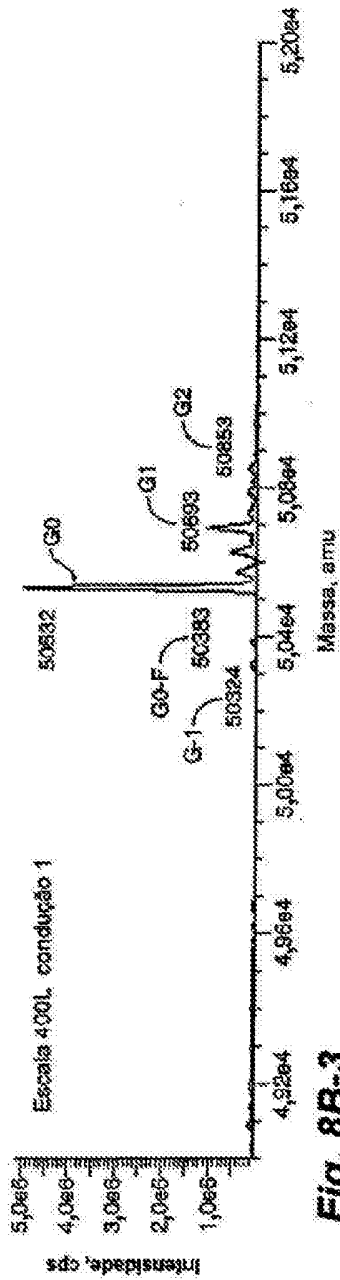
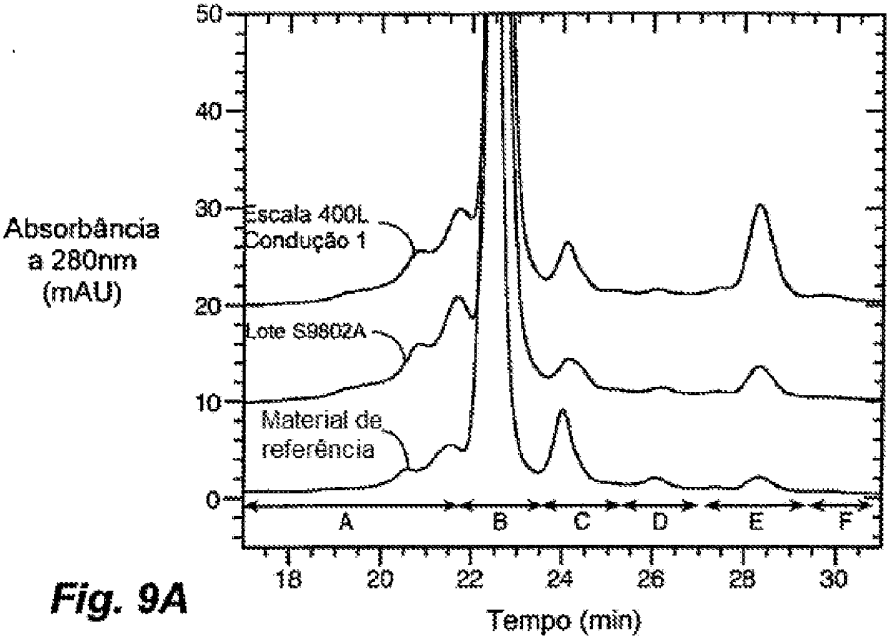
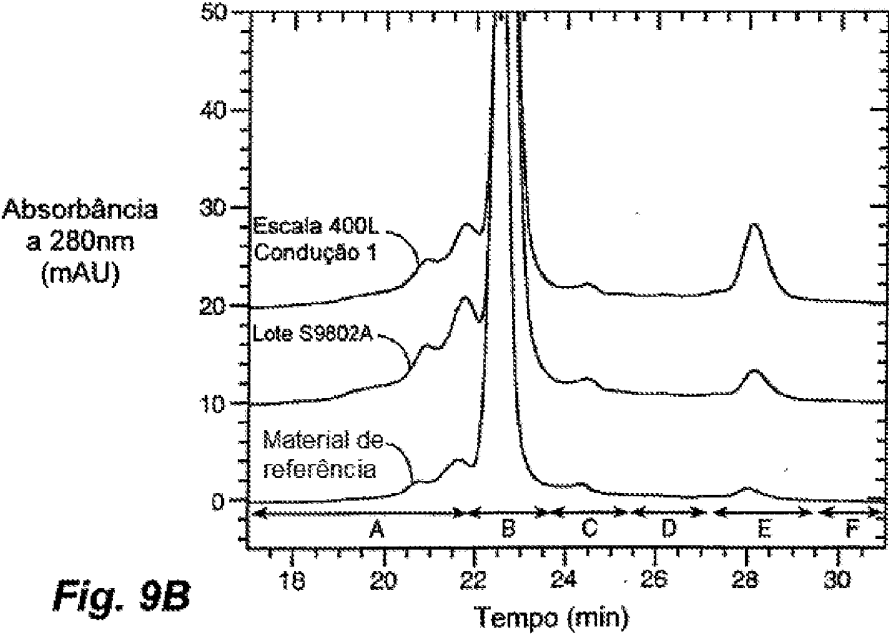


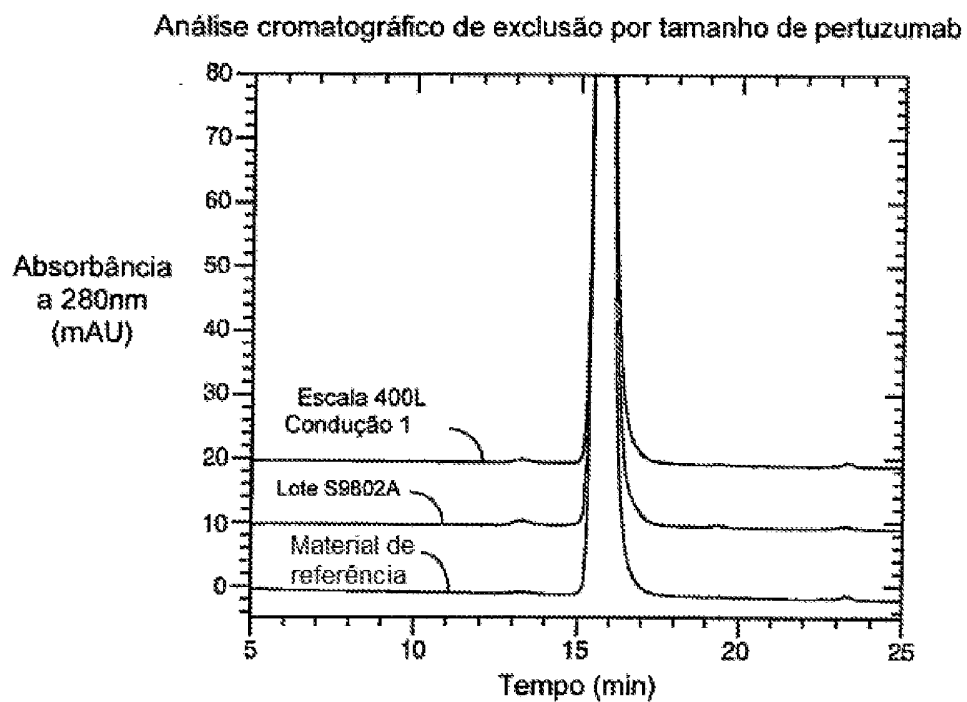
Fig. 8B-3

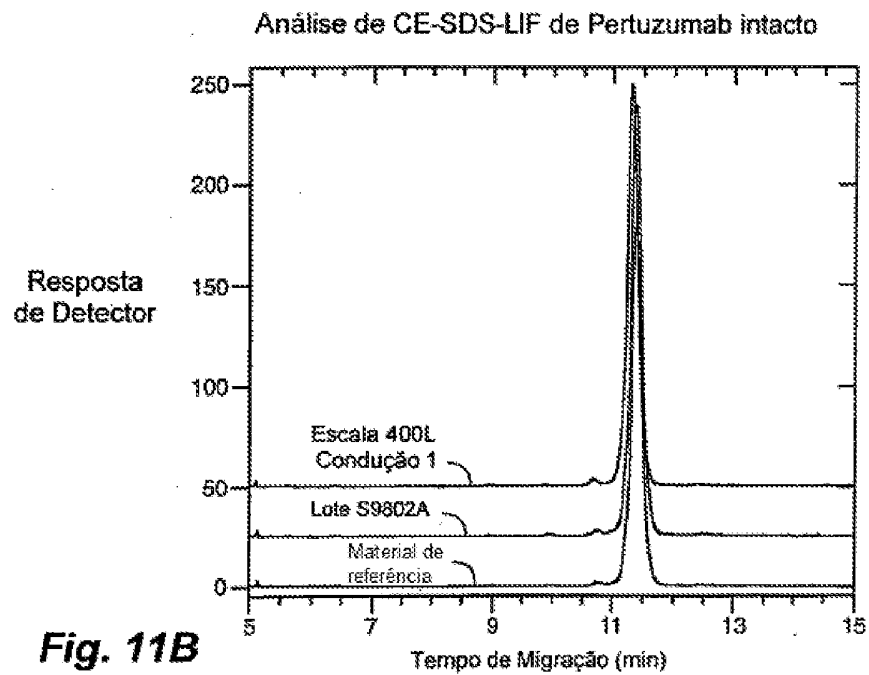
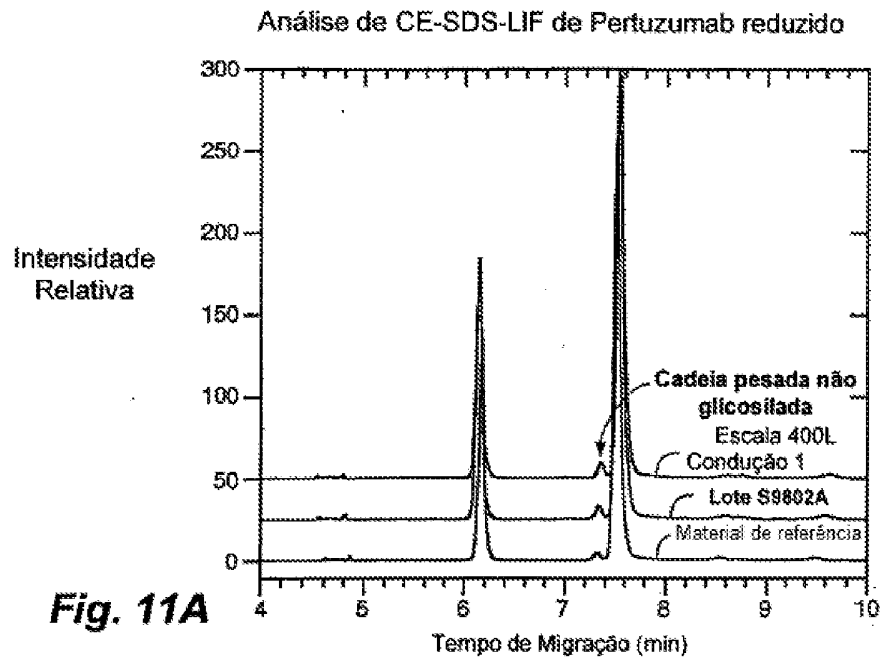
Análise de cromatografia de permuta catiónica de Pertuzumab Nativo



Análise de cromatografia de permuta catiónica de Pertuzumab CPB Digestivo



**Fig. 10**



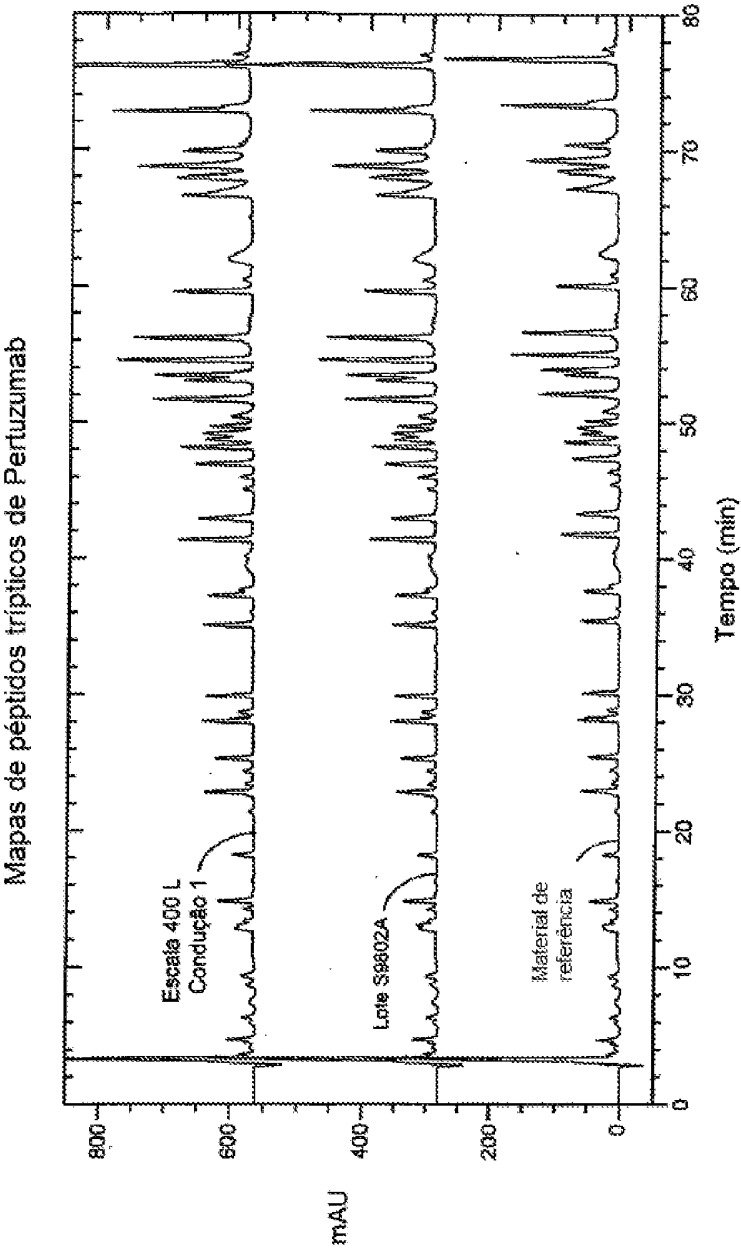


Fig. 12A

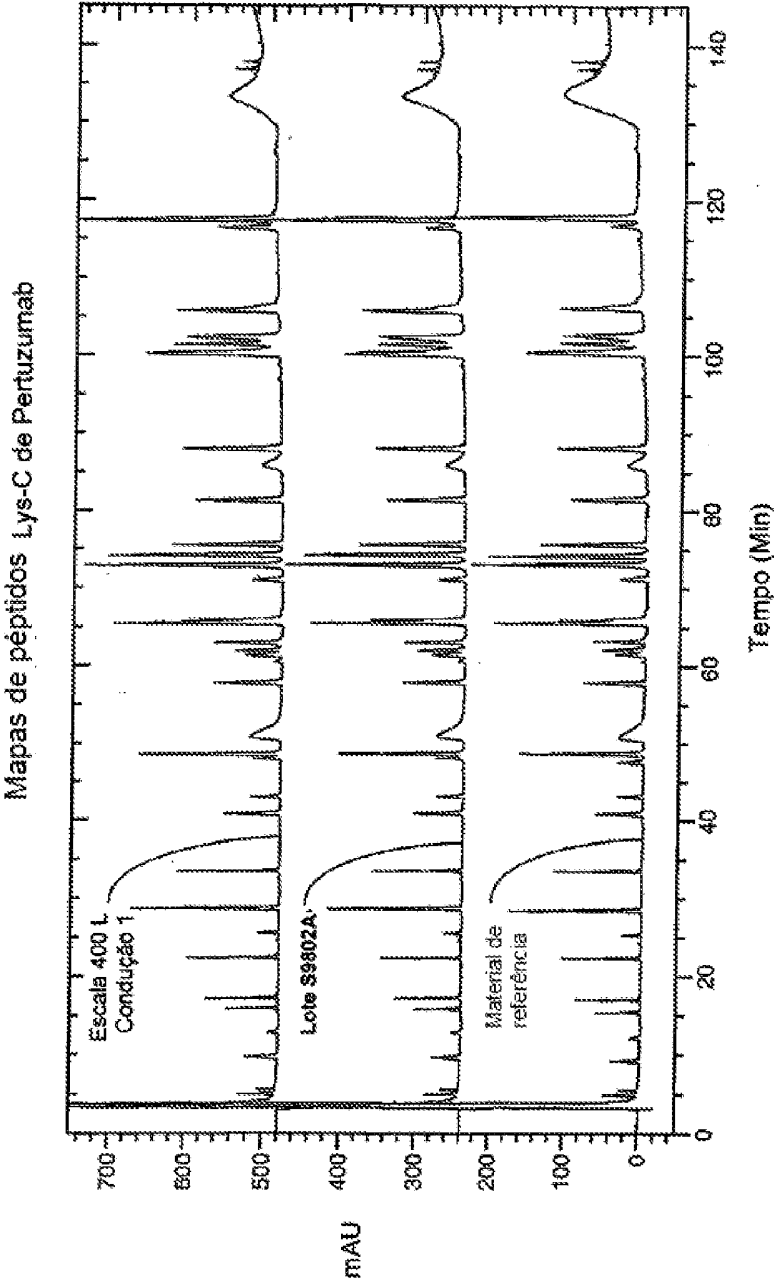


Fig. 12B

Análise CE dos oligossacáridos N-ligados libertados de Pertuzumab
Traços revertidos: Alinhados

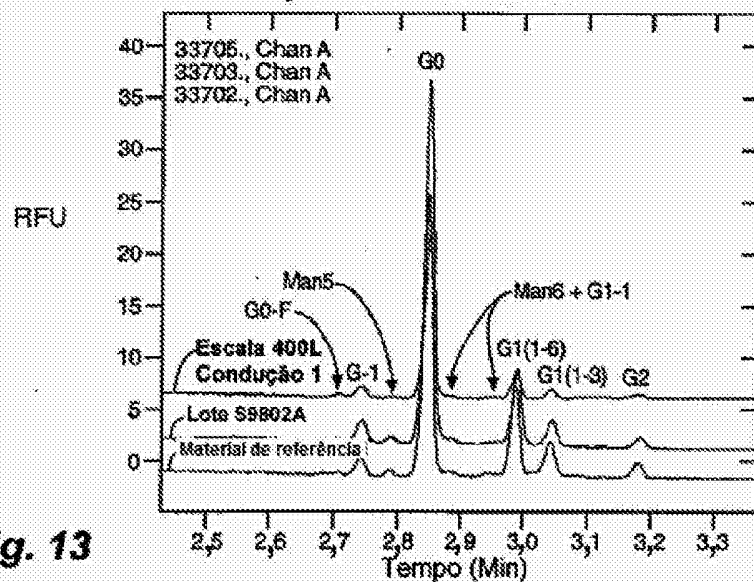


Fig. 13

Espectro de massa MALDI-TOF do modo positivo dos oligossacáridos neutros
libertados do Pertuzumab

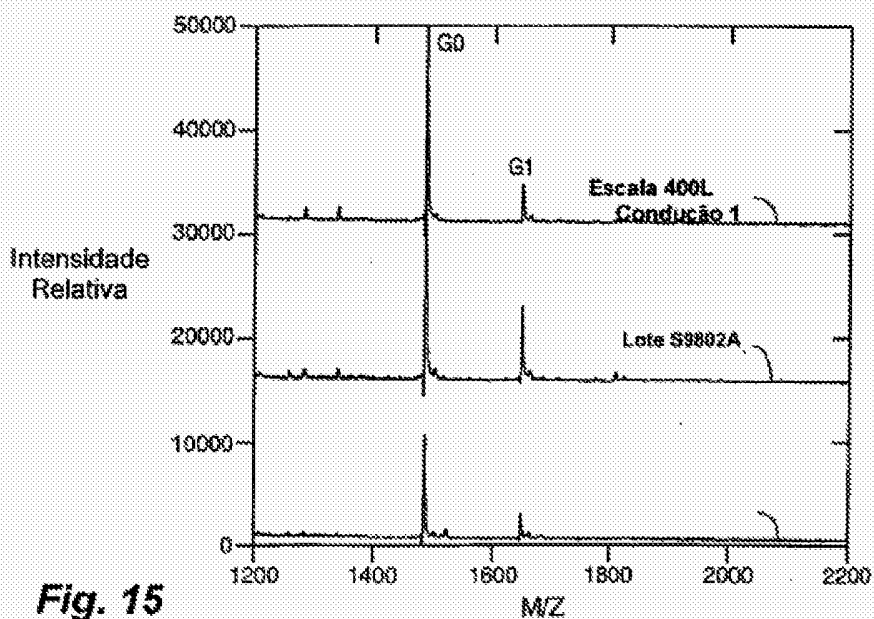


Fig. 15

Estrutura de oligossacárido comumente observado em anticorpos IgG

<u>Estruturas</u>	<u>Abreviação</u>	<u>Massa</u>
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$ 1	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	GO-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man6	1398

Fig. 14A

Estruturas de oligossacárido comumente observados em anticorpos IgG

<u>Estruturas</u>	<u>Abreviação</u>	<u>Massa</u>
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}\right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$	G1-1	1423
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-6)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$	G2	1788

As massas mostradas nessa figura correspondem aos valores de (M+Na)⁺

Fig. 14B

CADEIA LEVE

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K 45
15 30
46 L L I Y S A S F L Y S G V P S R P S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q 90
60 75
91 H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S O T A S V V C L 135
105 120
136 L N N F Y P P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T 180
150 165
181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 210 214

Fig. 16A

CADEIA PESADA

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIKDTYIHWVRQAPGKGL 45
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90
 91 TAVYYCSRWGCGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSS 135
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSOALTSGVHFFPAVLQSS 180
 181 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 226 THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNSTYRVVSVLTVLHQD 315
 316 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRHPQVYTLPPSREE 360
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG 405
 406 SPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHHAALHNHHTQKSLSLSPG 449

Fig. 16B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217 (SEQ ID NO. 23)

FIG._17A

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
 46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
 91 T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E M N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449
 (SEQ ID NO. 24)

FIG. 17B