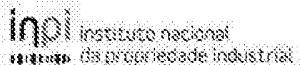


---

(11) Número de Publicação: **PT 2544680 E**



(51) Classificação Internacional:

**A61P 35/00** (2015.01) **A61K 31/337** (2015.01)  
**A61K 31/517** (2015.01) **A61K 39/00** (2015.01)  
**A61K 39/395** (2015.01) **A61K 45/06** (2015.01)  
**C07K 16/28** (2015.01) **C07K 16/30** (2015.01)  
**C07K 16/32** (2015.01)

---

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

---

(22) Data de pedido: **2011.03.11**

(30) Prioridade(s): **2010.03.11 US 312895 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2013.01.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.01.14**  
**087/2015**

(73) Titular(es):

**MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.**  
**ONE KENDALL SQUARE SUITE B7201**  
**CAMBRIDGE, MA 02139**

**US**

(72) Inventor(es):

**VICTOR MOYO**  
**GABRIELA GARCIA**

**US**  
**US**

(74) Mandatário:

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

**PT**

---

**(54) Epígrafe: USO DE INIBIDORES DE ERBB3 NO TRATAMENTO DE CANCRO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO**

(57) Resumo:

PROPORCIONAM-SE MÉTODOS PARA SUPRIMIR O CRESCIMENTO DE TUMORES DA MAMA TRIPLO NEGATIVO E TUMORES DA MAMA DO TIPO BASAL POR CONTACTO DE CÉLULAS DE TUMOR COM UM INIBIDOR DE ERBB3, E.G., UM ANTICORPO ANTI-ERBB3. TAMBÉM SE PROPORCIONAM MÉTODOS PARA TRATAR CANCRO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO OU CANCRO DA MAMA DE TIPO BASAL NUM DOENTE POR ADMINISTRAÇÃO AO DOENTE DE UM INIBIDOR DE ERBB3, E.G., UM ANTICORPO ANTI-ERBB3. OS MÉTODOS DE TRATAMENTO PODEM COMPREENDER ADICIONALMENTE SELECCIONAR UM DOENTE COM UM CANCRO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO OU CANCRO DA MAMA DE TIPO BASAL E SEGUIDAMENTE ADMINISTRAR UM INIBIDOR DE ERBB3 AO DOENTE. OS MÉTODOS DE TRATAMENTO PODEM TAMBÉM COMPREENDER ADICIONALMENTE ADMINISTRAR PELO MENOS UM AGENTE ANTI-CANCRO ADICIONAL AO DOENTE EM COMBINAÇÃO COM O INIBIDOR DE ERBB3.

RESUMO

**"Uso de inibidores de ErbB3 no tratamento de cancro da mama triplo negativo"**

Proporcionam-se métodos para suprimir o crescimento de tumores da mama triplo negativo e tumores da mama do tipo basal por contacto de células de tumor com um inibidor de ErbB3, e.g., um anticorpo anti-ErbB3. Também se proporcionam métodos para tratar cancro da mama triplo negativo ou cancro da mama de tipo basal num doente por administração ao doente de um inibidor de ErbB3, e.g., um anticorpo anti-ErbB3. Os métodos de tratamento podem compreender adicionalmente seleccionar um doente com um cancro da mama triplo negativo ou cancro da mama de tipo basal e seguidamente administrar um inibidor de ErbB3 ao doente. Os métodos de tratamento podem também compreender adicionalmente administrar pelo menos um agente anti-cancro adicional ao doente em combinação com o inibidor de ErbB3.

## DESCRIÇÃO

### **"Uso de inibidores de ErbB3 no tratamento de cancro da mama triplo negativo"**

#### Campo da invenção

Este pedido refere-se ao uso de inibidores de ErbB3 no tratamento de cancros da mama triplo negativo.

#### Antecedentes

O cancro da mama está entre os cancros mais comuns em mulheres e é a quinta causa mais comum de mortes por cancro. Devido à heterogeneidade dos cancros da mama, a sobrevida livre de progressão a 10 anos pode variar grandemente com o estágio e o tipo desde 98% a 10%. Diferentes formas de cancros da mama podem ter características biológicas e comportamentos clínicos nitidamente diferentes. Assim, a classificação do cancro da mama de um doente tornou-se uma componente crítica para determinar um regime de tratamento. Por exemplo, conjuntamente com a classificação do tipo histológico e grau, os cancros da mama são agora avaliados rotineiramente para expressão de receptores de hormona (receptor de estrogénio (ER) e receptor de progesterona (PR)) e para expressão de HER2 (ErbB2), dado estarem presentemente disponíveis várias modalidades de tratamento que têm com alvo receptores hormonais ou o receptor de HER2. ER e PR são ambos receptores nucleares (localizam-se predominantemente no núcleo celular, apesar de também se poderem encontrar na membrana celular) e têm-se desenvolvido pequenos inibidores moleculares que têm como alvo ER e/ou PR. O HER2 ou receptor de tipo 2 de factor de crescimento epidérmico humano, é um receptor normalmente localizado à superfície celular e têm-se desenvolvido para uso terapêutico anticorpos que têm como alvo HER2. O HER2 é o único membro da família EGFR (que também inclui HER1 (EGFR), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4) que não é capaz por si próprio de se ligar a um ligando de activação. Assim o HER2 é apenas funcional como receptor quando incorporado num complexo de receptor heterodimérico com outro membro da família EGFR, tal como HER3. Os cancros que se classificam como expressando o receptor de estrogénio (positivos para receptor de estrogénio ou tumores

ER+) podem ser tratados com um antagonista de Er tal como tamoxifeno. De igual modo, os cancros da mama classificados como expressando níveis elevados de receptor HER2 podem tratar-se com um anticorpo anti-HER2, tal como trastuzumab ou com um inibidor de tirosina cinase activo para receptor HER2 tal como lapatinib.

Cancro da mama triplo negativo (TN) é uma expressão usada para designar um subtipo de carcinomas da mama bem definidos e clinicamente relevantes que representam aproximadamente 15% de todos os casos de cancro da mama. Os tumores TN apresentam pontuação negativa (*i.e.*, usando métodos e critérios de histopatologia convencional) para expressão de ER e PR e não expressam níveis amplificados de HER2 (*i.e.*, são ER-, PR-, HER2-). O cancro da mama TN comprehende principal, mas não exclusivamente, um subtipo de cancro da mama distinto dos pontos de vista molecular e histopatológico conhecido como subtipo de tipo basal (BL). O subtipo BL também se caracteriza pela expressão de citoqueratinas (*e.g.*, CK, CK5/6, CK14, CK17) e outras proteínas presentes em células da mama normais basais/mioepiteliais. Contudo, além do subtipo BL, determinados outros tipos de cancros da mama, incluindo alguns "de tipo mama normal", carcinomas metaplásicos, carcinomas medulares e tumores do tipo de glândulas salivares podem também apresentar o fenótipo triplo negativo (TN). Além disso, os cancros da mama TN ocorrem mais frequentemente na presença de mutações BRCA1 e em mulheres na pré-menopausa de descendência africano-americana ou hispânica. Os tumores TN apresentam tipicamente um comportamento muito agressivo, com sobrevida após recidiva mais curta e taxas de sobrevida totais fracas relativamente a outros tipos de cancro da mama.

Nem todos os cancros da mama BL são TN. Os tumores da mama de tipo basal são um tipo de tumor heterogéneo que é responsável por até 15% de todos os cancros da mama e apresenta um comportamento clínico agressivo que os torna particularmente difícil de tratar com sucesso. A maioria dos cancros da mama BL são ER-, PR- e baixo HER2 (HER2<sup>1+</sup> ou negativo para HER2). Além disso, expressam tipicamente proteínas encontradas em células da mama normais basais (mioepiteliais). Estas incluem citoqueratinas de elevado peso molecular (*e.g.*, 5/6, 8, 14, 17 e 18), p-caderina, caveolinas 1 e 2, nestina, B cristalina e

EGFR. Além disso, as células de tumor BL não têm tipicamente capacidade de reparação de ADN por recombinação homóloga competente.

Histologicamente, a maioria dos cancros da mama BL são do tipo IDC-NST, grau histológico elevado e apresentam índices mitóticos muito elevados. Têm também tipicamente zonas necróticas ou fibróticas centrais, bordos em alargamento, infiltrados linfocíticos evidentes e características medulares típicas/atípicas e geralmente apresentam características semelhantes às do carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço induzido por vírus do papiloma humano.

Uma grande maioria dos carcinomas da mama medulares e medulares atípicos, metaplásicos, secretores, mioepiteliais e adenóides císticos também apresentam características BL.

Dada a ausência de expressão de receptores de hormona ou de quantidades significativas de HER2 em células de cancro da mama TN, as opções de tratamento têm sido muito limitadas dado que os tumores não são sensíveis a tratamentos que têm como alvo ER (e.g., tamoxifeno, inibidores de aromatase) ou HER2 (e.g., trastuzumab). Por sua vez, tratam-se estes tumores com regimes de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante convencionais, que têm eficácia limitada e muitos efeitos secundários citotóxicos. Além disso, tais regimes de quimioterapia podem levar a resistência a fármacos nos tumores e o risco de recorrência da doença em cancros da mama TN é maior nos primeiros três anos de tratamento do que para os outros tipos de cancros da mama.

Os cancros da mama de tipo basal são também difíceis de tratar e estão associados com prognósticos fracos, apesar dos carcinomas císticos adenóides BL estarem geralmente associados com melhores resultados clínicos, o seu uso para fabrico.

Em face do exposto, há necessidade de opções de tratamento adicionais e métodos para tratar cancros da mama triplo negativo e cancros da mama BL.

## **Sumário**

Proporcionam-se aqui métodos para tratar cancros da mama triplo negativo (e.g., tumores), incluindo cancros da mama de tipo basal (e.g., tumores), assim como composições farmacêuticas que podem ser usadas em tais métodos. Os métodos e composições baseiam-se, pelo menos parcialmente, na constatação que a inibição de ErbB3 pode suprimir o crescimento de células de cancro da mama TN tais como células de cancro da mama TN BL. Em particular, demonstra-se que a administração de anticorpo anti-ErbB3 suprime o crescimento de células de cancro da mama TN *in vivo*.

Assim, proporciona-se o uso de um inibidor de ErbB3 (e.g., seu uso para o fabrico de um medicamento) para o tratamento de cancro da mama TN, tal como cancro da mama TN BL. Noutro aspecto, proporciona-se um método de suprimir crescimento de um tumor de cancro da mama TN, tal como um tumor de cancro da mama TN BL, compreendendo o método por em contacto o tumor com uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3. Noutro aspecto, proporciona-se um método de suprimir crescimento de um tumor de cancro da mama TN, tal como um tumor de cancro da mama TN BL, num doente, compreendendo o método administrar ao doente uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3. Ainda noutro aspecto, proporciona-se um método de tratamento de um doente para um tumor de cancro da mama TN, tal como um tumor de cancro da mama TN BL, compreendendo o método administrar ao doente uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3. Ainda noutro aspecto, proporciona-se um método de tratamento de um tumor de cancro da mama, tal como um tumor de cancro da mama TN BL, num doente, compreendendo o método: seleccionar um doente com um tumor de cancro da mama triplo negativo, tal como um tumor de cancro da mama TN BL; e administrar ao doente uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3.

O inibidor de ErbB3 é um anticorpo anti-ErbB3. Um exemplo de anticorpo anti-ErbB3 é MM-121 (Ab nº 6), compreendendo sequências VH e VL tal como apresentado em SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente. Outro exemplo de anticorpo anti-ErbB3 é um anticorpo compreendendo, opcionalmente na ordem de amino terminal para carboxilo terminal, as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de VH tal como apresentado em SEQ ID NOS: 3-5,

respectivamente e opcionalmente na ordem de amino terminal para carboxilo terminal, as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de VL tal como apresentado em SEQ ID NOS: 6-8, respectivamente. Noutras concretizações, o anticorpo anti-ErbB3 é Ab nº 3 (compreendendo sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 9 e 10, respectivamente), Ab nº 14 (compreendendo sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 17 e 18, respectivamente), Ab nº 17 (compreendendo sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 25 e 26, respectivamente) ou Ab nº 19 (compreendendo sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 33 e 34, respectivamente). Ainda noutras concretizações, selecciona-se o anticorpo anti-ErbB3 do grupo que consiste de mAb 1B4C3, mAb 2D1D12, AMG-888 e mAb 8B8 humanizado. Noutra concretização, a administração do anticorpo anti-ErbB3 inibe o crescimento ou invasão ou metastização do tumor.

Os métodos aqui proporcionados podem ser usados no tratamento de cancros da mama TN de vários fenótipos histopatológicos diferentes. Por exemplo, numa concretização, o tumor de cancro da mama triplo negativo caracteriza-se histopatologicamente como apresentado um fenótipo do tipo basal. Noutra concretização, o tumor de cancro da mama TN caracteriza-se histopatologicamente como apresentado um fenótipo distinto de BL.

Em cada um dos métodos e composições anteriores, o inibidor de ErbB3 pode estar compreendido numa formulação compreendendo um transportador farmaceuticamente aceitável.

Noutro aspecto, os métodos de tratamento aqui proporcionados compreendem adicionalmente administrar ao doente pelo menos um agente anti-cancro adicional que não é um inibidor de ErbB3. Numa concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende pelo menos um fármaco quimioterapêutico, tal como um ou mais fármacos seleccionados do grupo que consiste de fármacos quimioterapêuticos baseados em platina, taxanos, inibidores de tirosina cinase e suas combinações. Foi agora observado que no subconjunto de cancros da mama TN que testam como HER2<sup>2+</sup>, o tratamento com agentes anti-HER2 tal como trastuzumab, pertuzumab ou lapatinib pode proporcionar benefícios quando utilizado em combinação com anticorpos anti-ErbB3. Assim noutro aspecto, os métodos de tratamento aqui

proporcionados compreendem administrar adicionalmente ao doente uma quantidade eficaz de pelo menos um agente anti-cancro adicional que é um agente anti-HER2. Tais agentes anti-HER2 são bem conhecidos e podem incluir um ou mais dos anticorpos anti-ErbB2 tal como C6.5 (e os seus numerosos derivados) descrito em patente US 5 977 322, trastuzumab, tal como descrito em patente US 6 054 297 e pertuzumab, tal como descrito em patente US 6 949 245; assim como agentes anti-HER2 que são moléculas pequenas tal como lapatinib (que também inibe EGFR tirosina cinase) e AG879.

Noutra concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende um inibidor de EGFR, tal como um anticorpo anti-EGFR ou um inibidor de molécula pequena de sinalização de EGFR. Um exemplo de anticorpo anti-EGFR compreende cetuximab. Outros exemplos de anticorpos anti-EGFR incluem matuzumab, panitumumab, nimotuzumab e mAb 806. Um exemplo de inibidor de sinalização de EGFR que é uma molécula pequena compreende gefitinib. Outros exemplos de inibidores de sinalização de EGFR úteis que são moléculas pequenas incluem lapatinib, canertinib, erlotinib HCL, pelitinib, PKI-166, PD158780 e AG 1478.

Ainda noutra concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende um inibidor de VEGF. Um exemplo de inibidor de VEGF compreende um anticorpo anti-VEGF, tal como o anticorpo bevacizumab.

Noutra concretização, a administração de um anticorpo anti-ErbB3 e do pelo menos um agente anti-cancro adicional inibe o crescimento ou capacidade de invasão ou de metastização do tumor.

Noutro aspecto, os métodos de tratar cancro da mama TN, tal como cancro da mama TN BL num doente compreendem administrar ao referido doente uma combinação compreendendo MM-121 e paclitaxel. Numa concretização a combinação apresenta sinergia terapêutica no tratamento de cancros da mama TN. Em alguns exemplos, a combinação efectua uma morte celular na ordem de log<sub>10</sub> de pelo menos 2,8, pelo menos 2,9 ou pelo menos 3,0. Noutros aspectos, a combinação proporciona uma melhoria na inibição do crescimento de tumor que é pelo menos cerca de

aditiva comparativamente à melhoria obtida com cada um dos agentes simples da combinação.

Noutra concretização, proporciona-se uma composição compreendendo uma combinação de MM-121 e paclitaxel, em que a combinação apresenta sinergia terapêutica no tratamento de cancros da mama TN. Em alguns exemplos, a combinação efectua uma morte celular na ordem de  $\log_{10}$  de pelo menos 2,8, pelo menos 2,9 ou pelo menos 3,0.

Também se proporcionam kits contendo as composições de combinações farmacêuticas.

#### **Descrição sucinta dos esquemas**

A **figura 1** é um gráfico que apresenta o volume de tumor relativo (%) de xenoenxerto MAXF449 (eixo dos YY - normalizado para o volume de tumor inicial) representado em função do tempo em dias após distribuição aleatória (eixo dos XX) em ratinhos nus NMRI tratados com MM-121 ou controlo de veículo. TGI = 200%.

A **figura 2** é um gráfico que apresenta a alteração de percentagem do volume de tumor relativo de xenoenxerto MDA-MB-231 (eixo dos YY - normalizado para o volume de tumor inicial) representado em função do tempo em dias após injecção de células MDA-MB-231 (eixo dos XX) em ratinhos nus Balb/c tratados com MM-121 ou controlo de veículo. As curvas com pontos temporais representados por quadrados ou círculos brancos indicam ratinhos tratados com MM-121. As curvas com pontos temporais representados por quadrados ou círculos pretos indicam controlos de veículo. Na figura inserida, "mp" indica que se injectaram as células MDA-MB-231 na gordura mamária, enquanto "sc" indica que se injectaram as células MDA-MB-231 subcutaneamente no flanco.

A **figura 3** é um gráfico que apresenta o volume do tumor MDA-MB-231 em  $\text{mm}^3$  (eixo dos YY) representado relativamente ao tempo em dias (eixo dos XX) com início aos 28 dias após injecção de células MDA-MB-231 na gordura mamária de ratinhos nus Balb/c. O tratamento foi com MM-121 (150  $\mu\text{g}/\text{ratinho}$ ), paclitaxel (5 mg/kg), uma combinação de MM-121 (150  $\mu\text{g}/\text{ratinho}$ ) e paclitaxel

(5 mg/kg) ou controlo de veículo. Quando se usa nas figuras, "mpk" = mg/kg.

A **figura 4** apresenta gráficos que mostram o volume de tumor MDA-MB-231 em mm<sup>3</sup> (eixo dos YY) representado relativamente ao tempo em dias (eixo dos XX) com início aos 28 dias após injecção de células MDA-MB-231 na gordura mamária de ratinhos nus Balb/c. A **figura 4A** representa o tratamento com MM-121, cetuximab ou paclitaxel; MM-121 e cetuximab; e a combinação tripla de MM-121 e cetuximab e paclitaxel. A **figura 4B** representa o tratamento com MM-121, erlotinib, MM-121 e erlotinib ou a combinação tripla de MM-121 e erlotinib e paclitaxel.

### **Descrição detalhada**

Proporcionam-se aqui métodos para tratar cancros da mama triplo negativo, assim como composições farmacêuticas que podem ser usadas para levar tais métodos à prática. Tal como descrito adicionalmente nos Exemplos, demonstrou-se agora que um inibidor de ErbB3, em particular um anticorpo anti-ErbB3, é capaz de suprimir o crescimento de células de cancro da mama TN *in vivo*. Consequentemente, proporcionam-se aqui métodos para suprimir o crescimento de cancros da mama TN, tal como cancros da mama TN BL, assim como métodos de tratar tais cancros da mama em doentes, usando um inibidor de anticorpo contra ErbB3.

#### **Definições:**

Tal como aqui utilizada, a expressão "triplo negativo" ou "TN" refere-se a tumores (e.g., carcinomas), tipicamente tumores da mama, nos quais as células de tumor têm pontuação negativa (i.e., usando métodos de histopatologia convencional) para receptor de estrogénio (ER) e para receptor de progesterona (PR), sendo ambos receptores nucleares (i.e., localizam-se predominantemente nos núcleos celulares) e as células de tumor não são amplificadas pelo receptor de factor de crescimento epidérmico do tipo 2 (HER2 ou ErbB2), um receptor normalmente localizado à superfície celular. Consideram-se que as células de tumor são negativas para expressão de ER e PR se menos de 5% dos núcleos das células de tumor forem corados para expressão de ER e PR usando técnicas de imuno-histoquímica padrão. Considera-se que as células de tumor são altamente amplificadas

para HER2 ("HER2<sup>3+</sup>") se, quando ensaiadas com um kit HercepTest™ (código K5204, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA), um ensaio semi-quantitativo de imuno-histoquímica usando um anticorpo policlonal anti-HER2 primário, proporcionarem uma pontuação de resultado de ensaio de 3+ ou o teste positivo HER2 por hibridação fluorescente in-situ (FISH). Tal como aqui utilizado, considera-se que as células de tumor são negativas para a sobreexpressão de HER2 caso proporcionem uma pontuação de resultado de ensaio de 0 ou 1+ ou 2+ ou se forem negativas em HER2 FISH.

Além disso, a expressão "cancro(s) da mama triplo negativo" ou "cancro(s) da mama TN" abrange carcinomas com diferentes fenótipos histopatológicos. Por exemplo, classificam-se determinados cancros da mama TN como "de tipo basal" ("BL"), nos quais as células neoplásicas expressam genes habitualmente encontrados em células da mama normais basais/mioepiteliais, tais como citoqueratinas basais de elevado peso molecular (CK, CK5/6, CK14, CK17), vimentina, p-caderina, B cristalina, fascina e caveolinas 1 e 2. Determinados outros cancros da mama TN, contudo, têm um fenótipo histopatológico diferente, incluindo os exemplos carcinoma ductal invasivo de grau elevado sem outra especificação, carcinomas metaplásicos, carcinomas medulares e tumores da mama do tipo de glândulas salivares.

As expressões "ErbB3", "HER3", "receptor ErbB3" e "receptor HER3" tal como aqui usadas indiferentemente, referem-se à proteína ErbB3 humana, tal como descrita na patente U.S. nº 5 480 968.

Tal como aqui usada, pretende-se que a expressão "inibidor de ErbB3" inclua agentes terapêuticos que inibem, modulam negativamente, suprimem ou regulam negativamente a actividade de ErbB3. Pretende-se que a expressão inclua compostos químicos, tais como inibidores que são moléculas pequenas e agentes biológicos, tais como anticorpos, ARN de interferência (ARNsh, ARNsi), receptores solúveis e semelhantes. Um exemplo de inibidor de ErbB3 é um anticorpo anti-ErbB3.

Um "anticorpo" tal como aqui utilizado é uma proteína que consiste de um ou mais polipéptidos compreendendo domínios de ligação substancialmente codificados por genes de

imunoglobulina ou fragmentos de genes de imunoglobulina, em que a proteína se liga imuno-especificamente a um antigénio. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes das regiões constantes kapa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon e miu, assim como uma miríade de genes de regiões variáveis de imunoglobulina. As cadeias leves classificam-se como kapa ou lambda. As cadeias pesadas classificam-se como gama, miu, alfa, delta ou épsilon, o que por sua vez define as classes de imunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Uma unidade estrutural de imunoglobulina típica compreende um tetrâmero que é composto por dois pares idênticos de cadeias de polipéptido, tendo cada par uma cadeia "leve" (cerca de 25 kD) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kD). "V<sub>L</sub>" e "V<sub>H</sub>" referem-se a essas cadeias leve e pesada, respectivamente.

Os anticorpos incluem imunoglobulinas intactas assim como seus fragmentos de ligação de antigénio, que podem ser produzidos por digestão com diferentes peptidases ou sintetizados de novo quer quimicamente, quer usando tecnologia de expressão de ADN recombinante. Tais fragmentos incluem, por exemplo, dímeros F(ab)<sub>2</sub> e monómeros Fab. Os anticorpos úteis incluem anticorpos de cadeia simples (anticorpos que existem como uma cadeia polipeptídica única), e.g., anticorpos Fv em cadeia simples (scFv) nos quais as cadeias V<sub>H</sub> e a V<sub>L</sub> estão ligadas conjuntamente (directamente ou através de um péptido ligante) para formar um polipéptido contínuo.

"Imuno-específico" ou "imuno-especificamente" refere-se a anticorpos que se ligam através de domínios substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou fragmentos de genes de imunoglobulina a um ou mais epítopos de uma proteína de interesse, mas que não reconhecem e se ligam substancialmente a outras moléculas numa amostra contendo uma população mista de moléculas antigénicas. Tipicamente, um anticorpo liga-se imuno-especificamente a um antigénio cognato com uma K<sub>d</sub> com um valor não superior a 50 nM, tal como medido por um ensaio de ressonância plasmónica de superfície ou por um ensaio de ligação celular. O uso de tais ensaios é bem conhecido na especialidade e descreve-se no exemplo 3, seguidamente.

Um "anticorpo anti-ErbB3" é um anticorpo que se liga imuno-especificamente ao ectodomínio de ErbB3 e um "anticorpo anti-

ErbB2" é um anticorpo que se liga imuno-especificamente ao ectodomínio de ErbB2. O anticorpo pode ser um anticorpo isolado. Tal ligação a ErbB3 ou ErB2 apresenta um  $K_d$  com um valor não superior a 50 nM tal como medido por um ensaio de ressonância plasmónica de superfície ou por um ensaio de ligação celular. Um anticorpo anti-ErbB3 pode ser um anticorpo isolado. Os exemplos de anticorpos anti-ErbB3 inibem fosforilação de ErbB3 mediada por ligando do tipo EGF. Os ligandos do tipo EGF incluem EGF, TGF $\beta$ , betacelulina, factor de crescimento epidérmico de ligação de heparina, birregulina, epigénio, epirregulina e anfirregulina, que se ligam tipicamente a ErbB1 e induzem heterodimerização de ErbB1 com ErbB3.

Tal como aqui utilizada, pretende-se que a expressão "inibidor de EGFR" inclua agentes terapêuticos que inibem, modulam negativamente, suprimem ou regulam negativamente a actividade de sinalização de EGFR. Pretende-se que a expressão inclua compostos químicos, tais como inibidores que são moléculas pequenas (e.g., inibidores de tirosina cinase que são moléculas pequenas) e agentes biológicos, tais como anticorpos, ARN de interferência (ARNsh, ARNsi), receptores solúveis e semelhantes.

Tal como aqui utilizada, pretende-se que a expressão "inibidor de VEGF" inclua agentes terapêuticos que inibem, modulam negativamente, suprimem ou regulam negativamente a actividade de sinalização de VEGF. Pretende-se que a expressão inclua compostos químicos, tais como inibidores que são moléculas pequenas (e.g., inibidores de tirosina cinase que são moléculas pequenas) e agentes biológicos, tais como anticorpos, ARN de interferência (ARNsh, ARNsi), receptores solúveis e semelhantes.

As expressões "suprimir", "supressão", "inibir" e "inibição" tal como aqui usadas indiferentemente, referem-se a qualquer diminuição estatisticamente significativa na actividade biológica (e.g., crescimento de célula tumoral), incluindo bloqueamento total da actividade. Por exemplo, "inibição" pode referir-se a uma diminuição de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% da actividade biológica.

A expressão "doente" inclui um humano ou outro animal mamífero que recebe tratamento profiláctico ou terapêutico.

As expressões "tratar", "tratando" e "tratamento" tal como aqui usadas, referem-se a medidas terapêuticas ou preventivas tal como as aqui descritas. Os métodos de "tratamento" utilizam a administração a um doente de um inibidor de ErbB3 aqui proporcionado, por exemplo, um doente com um tumor de cancro da mama TN ou BL, de modo a prevenir, curar, atrasar ou reduzir a gravidade ou melhorar um ou mais sintomas da doença ou distúrbio ou da doença ou distúrbio recorrente ou de modo a prolongar a sobrevivência de um doente para além do esperado na ausência de tal tratamento.

A expressão "quantidade eficaz" tal como aqui utilizada, refere-se à quantidade de um agente, tal como um inibidor de ErbB3, por exemplo um anticorpo anti-ErbB3, que é suficiente para efectuar tratamento, prognóstico ou diagnóstico de um cancro da mama TN ou BL, quando administrado a um doente. Uma quantidade terapeuticamente eficaz variará dependendo do doente e do estado da doença a ser tratada, do peso e idade do doente, da gravidade do estado de doença, do modo de administração e semelhantes, que podem ser facilmente determinados pelo perito na especialidade. As dosagens para administração podem variar entre, por exemplo, cerca de 1 ng a cerca de 10 000 mg, cerca de 5 ng a cerca de 9 500 mg, cerca de 10 ng a cerca de 9 000 mg, cerca de 20 ng a cerca de 8 500 mg, cerca de 30 ng a cerca de 7 500 mg, cerca de 40 ng a cerca de 7 000 mg, cerca de 50 ng a cerca de 6 500 mg, cerca de 100 ng a cerca de 6 000 mg, cerca de 200 ng a cerca de 5 500 mg, cerca de 300 ng a cerca de 5 000 mg, cerca de 400 ng a cerca de 4 500 mg, cerca de 500 ng a cerca de 4 000 mg, cerca de 1 µg a cerca de 3 500 mg, cerca de 5 µg a cerca de 3 000 mg, cerca de 10 µg a cerca de 2 600 mg, cerca de 20 µg a cerca de 2 575 mg, cerca de 30 µg a cerca de 2 550 mg, cerca de 40 µg a cerca de 2 500 mg, cerca de 50 µg a cerca de 2 475 mg, cerca de 100 µg a cerca de 2 450 mg, cerca de 200 µg a cerca de 2 425 mg, cerca de 300 µg a cerca de 2 000, cerca de 400 µg a cerca de 1 175 mg, cerca de 500 µg a cerca de 1 150 mg, cerca de 0,5 mg a cerca de 1 125 mg, cerca de 1 mg a cerca de 1 100 mg, cerca de 1,25 mg a cerca de 1 075 mg, cerca de 1,5 mg a cerca de 1 050 mg, cerca de 2,0 mg a cerca de 1 025 mg, cerca de 2,5 mg a cerca de 1 000 mg, cerca de 3,0 mg a cerca de

975 mg, cerca de 3,5 mg a cerca de 950 mg, cerca de 4,0 mg a cerca de 925 mg, cerca de 4,5 mg a cerca de 900 mg, cerca de 5 mg a cerca de 875 mg, cerca de 10 mg a cerca de 850 mg, cerca de 20 mg a cerca de 825 mg, cerca de 30 mg a cerca de 800 mg, cerca de 40 mg a cerca de 775 mg, cerca de 50 mg, a cerca de 750 mg, cerca de 100 mg a cerca de 725 mg, cerca de 200 mg a cerca de 700 mg, cerca de 300 mg a cerca de 675 mg, cerca de 400 mg a cerca de 650 mg, cerca de 500 mg ou cerca de 525 mg a cerca de 625 mg de um anticorpo ou seu fragmento de ligação a抗igénio, tal como aqui proporcionado. A dosagem pode ser, e.g., semanal, de 2 em 2 semanas, de 3 em 3 semanas, de 4 em 4 semanas, de 5 em 5 semanas ou de 6 em 6 semanas. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar uma resposta terapêutica óptima. Uma quantidade eficaz é também aquela que permite que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais (efeitos secundários) do agente sejam minimizados e/ou ultrapassados pelos efeitos benéficos. Para MM-121, a administração pode ser intravenosa a exactamente ou a cerca de 6 mg/kg ou 12 mg/kg semanalmente ou 12 mg/kg ou 24 mg/kg duas vezes por semana. Descrevem-se seguidamente regimes de dosagem adicionais.

As expressões "agente anti-cancro" e "agente antineoplásico" referem-se a fármacos usados para tratar malignidades, tal como crescimentos cancerosos. A terapia de fármacos pode ser usada sozinha ou em combinação com outros tratamentos tal como cirurgia ou terapia de radiação.

Nas subsecções seguintes descrevem-se com detalhe adicional vários aspectos e concretizações.

### I. Inibidores de ErbB3

Tal como descrito aqui com detalhe adicional, os métodos e composições aqui proporcionados envolvem o uso de um ou mais inibidores de ErbB3.

Pelo menos um dos inibidores de ErbB3 é um anticorpo anti-ErbB3, e.g., um anticorpo monoclonal. Um exemplo de anticorpo monoclonal anti-ErbB3 é MM-121, descrito adicionalmente em WO 2008/100624 e patente US nº 7 846 440 e com sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO:2, respectivamente. Alternativamente, o anticorpo monoclonal anti-

ErbB3 é um anticorpo que compete com MM-121 para ligação a ErbB3. Noutra concretização, o anticorpo anti-ErbB3 é um anticorpo compreendendo as sequências CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de MM-121, que se apresentam em SEQ ID NOS: 3-5 (CDR1, CDR2, CDR3 de V<sub>H</sub>) e 6-8 (CDR1, CDR2, CDR3 de V<sub>L</sub>), respectivamente. Outros exemplos de anticorpos anti-ErbB3 incluem Ab nº 3, Ab nº 14, Ab nº 17 e Ab nº 19, também descritos adicionalmente em WO 2008/100624 e com as sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentadas em SEQ ID NOS: 9 e 10, 17 e 18, 25 e 26 e 33 e 34 respectivamente. Noutra concretização, o anticorpo anti-ErbB3 é um anticorpo compreendendo as sequências CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de Ab nº 3 (apresentadas nas SEQ ID NOS: 11-13 e 14-18, respectivamente) ou um anticorpo compreendendo as sequências CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de Ab nº 14 (apresentadas nas SEQ ID NOS: 19-21 e 22-24, respectivamente) ou um anticorpo compreendendo as sequências CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de Ab nº 17 (apresentadas nas SEQ ID NOS: 27-29 e 30-32, respectivamente) ou um anticorpo compreendendo as sequências CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de Ab nº 19 (apresentadas nas SEQ ID NOS: 35-37 e 38-40, respectivamente).

Alternativamente, o anticorpo anti-ErbB3 é um anticorpo monoclonal ou sua parte de ligação de抗原 que se liga a um epítopo de ErbB3 humano compreendendo os resíduos 92-104 de SEQ ID NO:41 e se caracteriza pela inibição da proliferação de uma célula de cancro que expressa ErbB3. A célula de cancro pode ser uma célula MALME-3M, uma célula AdrR ou uma célula ACHN e a proliferação pode ser reduzida em pelo menos 10% relativamente ao controlo. Numa concretização adicional este anticorpo monoclonal isolado ou sua parte de ligação de抗原 liga-se a um epítopo compreendendo os resíduos 92-104 e 129 de SEQ ID NO:41.

Outros exemplos de anticorpos anti-ErbB3 úteis incluem os anticorpos 1B4C3 e 2D ID 12 (U3 Pharma AG), sendo ambos descritos na publicação de pedido de patente US nº 20040197332 de Ullrich et al. e anticorpos monoclonais (incluindo as suas versões humanizadas), tal como AMG-888 (U3 Pharma AG e Amgen) e 8B8, tal como descrito em patente U.S. 5 968 511 de Akita et al.

Ainda noutra concretização, o anticorpo anti-ErbB3 pode compreender uma mistura ou cocktail de dois ou mais anticorpos

anti-ErbB3, ligando-se cada um deles a um epítopo diferente em ErbB3. Numa concretização, a mistura ou cocktail comprehende três anticorpos anti-ErbB3 ligando-se cada um deles a um epítopo diferente em ErbB3.

Noutra concretização, o inibidor de ErbB3 comprehende uma molécula de ácido nucleico tal como uma molécula de ARN que inibe a expressão ou actividade de ErbB3. Os antagonistas de ARN de ErbB3 têm sido descritos na especialidade (consultar e.g., publicação de pedido de patente US nº 20080318894). Além disso, têm sido descritos na especialidade ARN de interferência específicos para ErbB3, tal como ARNsh ou ARNsi que inibem especificamente a expressão e/ou actividade de ErbB3.

Ainda noutra concretização, o inibidor de ErbB3 comprehende uma forma solúvel do receptor ErbB3 que inibe a sinalização através da via ErbB3. Tais moléculas de ErbB3 solúveis têm sido descritas na especialidade (consultar e.g., patente U.S. nº 7 390 632, publicação de pedido de patente U.S. nº 20080274504 e publicação de pedido de patente U.S. nº 20080261270, cada uma de Maihle *et al* e publicação de pedido de patente U.S. nº 20080057064 de Zhou).

## II. Métodos

Num aspecto, proporciona-se o uso de um inibidor de ErbB3 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro da mama TN, tal como cancro da mama TN BL.

Num método de suprimir crescimento de uma célula de cancro da mama triplo negativo, pode pôr-se a célula em contacto com uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3.

Noutro aspecto, proporciona-se um inibidor de ErbB3 para uso num método de tratamento de um tumor de cancro da mama TN num doente, em que o inibidor é um anticorpo contra ErbB3.

Um método de tratamento de um tumor de cancro da mama num doente pode compreender:

seleccionar um doente com um tumor de cancro da mama TN; e administrar ao doente uma quantidade eficaz de um inibidor de ErbB3.

Noutro aspecto, o doente com um tumor de cancro da mama TN é um doente adicionalmente seleccionado por uso dos métodos de selecção divulgados no pedido internacional WO2010/019952.

Pode obter-se identificação de células de cancro da mama triplo negativo ou de um doente com um tumor de cancro da mama triplo negativo, através de métodos padrão bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, a coloração imuno-histoquímica (IHC) é utilizada rotineiramente em análise de biopsias e permite a detecção, localização e quantificação relativa de ER, PR e HER2 no interior de secções de tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina (e.g., tecidos de cancro da mama processados rotineiramente para avaliação histológica). No contexto da identificação de tumores TN, a coloração de menos de 5% dos núcleos de células tumorais considera-se negativo para cada um de ER e PR. O anticorpo primário usado para coloração IHC de ER é e.g., 1D5 (Chemicon, Temecula CA, nº de catálogo IHC2055). O anticorpo primário usado para coloração IHC de PR é e.g., PgR636 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, nº de catálogo MS-1882-R7) ou PgR 1294 (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, código M3568). O ensaio IHC de ErbB2 usado é e.g., o kit HercepTest™ (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, código K5204), um ensaio IHC semi-quantitativo usando anticorpo primário anti-HER2 policlonal para determinar sobreexpressão de proteína HER2 em tecidos de cancro da mama processados rotineiramente para avaliação histológica, que é usado de acordo com as indicações do fabricante. No contexto de identificar tumores TN, um resultado de teste de 0 a 1+ considera-se negativo para Her2.

Numa concretização, o tumor de cancro da mama triplo negativo caracteriza-se histopatologicamente como tendo um fenótipo de tipo basal. Noutra concretização, o tumor de cancro da mama triplo negativo caracteriza-se histopatologicamente como tendo um fenótipo diferente de tipo basal. Os exemplos de fenótipos histopatológicos de cancro da mama TN que são diferentes de BL incluem carcinoma ductal invasivo de grau elevado sem outra especificação, carcinomas metaplásicos, carcinomas medulares e tumores da mama do tipo de glândulas salivares.

Num aspecto, o cancro da mama TN a tratar com inibidor de ErbB3 co-expressa ErbB1 (EGFR), ErbB3 e herregulina (HRG). A expressão de EGFR e HRG pode ser identificada por RT-PCR ou por técnicas de imuno-ensaio padrão, tal como ensaio de ELISA ou coloração imuno-histoquímica de tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina (e.g., tecidos de cancro da mama processados rotineiramente para avaliação histopatológica), usando um anticorpo anti-EGFR, anticorpo anti-ErbB3 ou um anticorpo anti-HRG. As características adicionais dos tumores para tratamento de acordo com a divulgação aqui são estabelecidos na publicação de patente U.S. pendente nº 20110027291, que reivindica prioridade ao pedido PCT nº WO2010/019952.

O inibidor de ErbB3 administrado ao doente é um anticorpo anti-ErbB3. Um exemplo de anticorpo anti-ErbB3 é MM-121, compreendendo as sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente ou um anticorpo compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de V<sub>H</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 3-5, respectivamente e as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 de V<sub>L</sub> tal como apresentado em SEQ ID NOS: 6-8, respectivamente (i.e., as CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de MM-121). Descrevem-se detalhadamente na subsecção I anteriormente exemplos adicionais não limitativos de anticorpos anti-ErbB3 e outras formas de inibidores de ErbB3.

Pode administrar-se o inibidor de ErbB3 ao doente por qualquer via adequada para a entrega eficaz do inibidor ao doente. Por exemplo, muitos inibidores que são moléculas pequenas são adequados para administração oral. Os anticorpos e outros agentes biológicos são tipicamente administrados parentericamente, e.g., intravenosamente, intraperitonealmente, subcutaneamente ou intramuscularmente. Descrevem-se mais detalhadamente seguidamente várias vias de administração, dosagens e formulações farmacêuticas adequadas para uso nos métodos aqui proporcionados.

### III. Composições farmacêuticas

Noutro aspecto, proporcionam-se composições farmacêuticas que podem ser usadas nos métodos aqui divulgados, i.e.,

composições farmacêuticas para tratar tumores de cancro da mama TN.

Numa concretização, as composições farmacêuticas para tratar cancro da mama TN compreendem o inibidor de ErbB3 e um transportador farmacêutico. O inibidor de ErbB3 pode ser formulado com o transportador farmacêutico numa composição farmacêutica. Adicionalmente, a composição farmacêutica pode incluir, por exemplo, instruções para uso da composição para o tratamento de doentes para tumores de cancro da mama TN.

O inibidor de ErbB3 na composição é um anticorpo anti-ErbB3, e.g., MM-121 ou um anticorpo compreendendo as CDR de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de MM-121 posicionadas no anticorpo na mesma ordem relativa em que estão presentes em MM-121 de modo a proporcionar ligação imuno-específica de ErbB3. Descrevem-se detalhadamente na subsecção I anteriormente exemplos adicionais não limitativos de anticorpos anti-ErbB3 e outras formas de inibidores de ErbB3.

Tal como usado aqui, "transportador farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de atraso de absorção, tampões e outros excipientes que são fisiologicamente compatíveis. Preferentemente, o transportador é adequado para administração parentética, oral ou tópica. Dependendo da via de administração, o composto, e.g., molécula pequena ou agente biológico, pode ser revestido por um material para proteger o composto da acção de ácidos e outras condições naturais que podem inactivar o composto.

Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas ou dispersões estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis, assim como excipientes convencionais para a preparação de comprimidos, pílulas, cápsulas e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para a formulação de substâncias farmaceuticamente activas é conhecida na especialidade. Excepto na medida em que quaisquer meios ou agentes convencionais sejam incompatíveis com o composto activo, considera-se o seu uso nas composições farmacêuticas proporcionadas aqui. Podem também incorporar-se nas composições compostos activos suplementares.

Um transportador farmaceuticamente aceitável pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Os exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tal como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galhato de propilo, alfa-tocoferol e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metal tal como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

Os exemplos de transportadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas aqui proporcionadas incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e semelhantes) e suas misturas adequadas e ésteres orgânicos injectáveis tal como oleato de etilo. Quando necessário, pode manter-se uma fluidez adequada, por exemplo, por uso de materiais de revestimento tal como lecitina, por manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de tensioactivos. Em muitos casos, será útil incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Pode conseguir-se absorção prolongada das composições injectáveis por inclusão na composição de um agente que atrase a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Estas composições podem também conter excipientes funcionais tais como conservantes, agentes de molhagem, agentes emulsionantes e agentes dispersantes.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis, não pirogénicas e estáveis nas condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, micro-emulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para elevada concentração de fármaco.

Podem preparar-se soluções injectáveis estéreis por incorporação do composto activo na quantidade necessária num

solvente adequado com um ou uma combinação dos ingredientes anteriormente enumerados, tal como necessário, seguido de esterilização, e.g., por microfiltração. De um modo geral, preparam-se dispersões por incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários dos anteriormente enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos de preparação incluem secagem em vácuo e liofilização que origina um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente pretendido adicional de uma sua solução previamente esterilizada por filtração. Podem misturarse o(s) ingrediente(s) activo(s) em condições estéreis com um ou mais transportadores farmaceuticamente aceitáveis adicionais e com quaisquer conservantes, tampões ou propulsores que possam ser necessários.

A prevenção da presença de microorganismos pode ser assegurada tanto pelos procedimentos de esterilização anteriores como pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico e semelhantes. Pode também pretender incluir-se agentes isotónicos tais como açúcares, cloreto de sódio e semelhantes nas composições. Além disso, pode conseguir-se absorção prolongada da forma farmaceuticamente injectável pela inclusão de agentes que atrasam a absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Podem administrar-se composições farmacêuticas compreendendo um inibidor de ErbB3 sozinhas ou em terapia de combinação. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição aqui proporcionada compreendendo um inibidor de ErbB3 e pelo menos um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tal como um ou mais agentes quimioterapêuticos conhecidos na especialidade, discutidos mais detalhadamente na subsecção IV seguidamente. Podem também administrar-se as composições farmacêuticas em conjunção com terapia de radiação e/ou cirurgia.

Ajustam-se os regimes de dosagem para proporcionar a resposta pretendida óptima (e.g., uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode administrar-se um único bolus, podem administrar-se várias doses divididas ao longo do tempo ou a

dose pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente tal como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Os exemplos de gamas de dosagens para administração de um anticorpo incluem: 10-1000 mg (anticorpo)/kg (peso corporal do doente), 10-800 mg/kg, 10-600 mg/kg, 10-400 mg/kg, 10-200 mg/kg, 30-1000 mg/kg, 30-800 mg/kg, 30-600 mg/kg, 30-400 mg/kg, 30-200 mg/kg, 50-1000 mg/kg, 50-800 mg/kg, 50-600 mg/kg, 50-400 mg/kg, 50-200 mg/kg, 100-1000 mg/kg, 100-900 mg/kg, 100-800 mg/kg, 100-700 mg/kg, 100-600 mg/kg, 100-500 mg/kg, 100-400 mg/kg, 100-300 mg/kg e 100-200 mg/kg. Os exemplos de calendários de dosagens incluem de três em três dias, de cinco em cinco dias, de sete em sete dias (*i.e.*, uma vez por semana), de 10 em 10 dias, de 14 em 14 dias (*i.e.*, uma vez em cada duas semanas), de 21 em 21 dias (*i.e.*, uma vez em cada três semanas), de 28 em 28 dias (*i.e.*, uma vez em cada quatro semanas) e uma vez por mês.

Pode ser vantajoso formular composições parentéricas em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Tal como aqui usada, forma de dosagem unitária refere-se a unidades fisicamente independentes adequadas como dosagens unitárias para os doentes a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de agente activo, calculada para produzir o efeito terapêutico pretendido, em associação com qualquer transportador farmacêutico necessário. A especificação das formas de dosagem unitária é ditada e directamente dependente de (a) as características únicas do composto activo e o efeito terapêutico específico a atingir e (b) as limitações inerentes à especialidade de preparar composições de tal composto activo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Os níveis de dosagem efectivos dos ingredientes activos nas composições farmacêuticas aqui divulgadas podem variar de modo a obter uma quantidade do ingrediente activo que é eficaz para atingir a resposta terapêutica pretendida para um doente, composição e modo de administração específicos, sem ser tóxico para o doente. Tal como aqui usado, "parentérica" no contexto de administração significa modos de administração diferentes de administração entérica e tópica, usualmente por injecção, e inclui injecção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital,

intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intra-espinal, epidural e intra-esternal, não se lhes limitando.

As frases "administração parentérica" e "administrado parentericamente" tal como aqui usadas referem-se a modos de administração diferentes da administração entérica (*i.e.* através do tracto digestivo) e tópica, usualmente por injecção ou infusão, e inclui injecção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intra-espinal, epidural e intra-esternal, não se lhes limitando. A injecção e infusão intravenosas são frequentemente (mas não exclusivamente) usadas para administração de anticorpo.

Quando se administraram os agentes aqui proporcionados como agentes farmacêuticos a humanos ou animais, eles podem ser administrados sozinhos ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,001 a 90% (*e.g.*, 0,005 a 70%, *e.g.*, 0,01 a 30%) do ingrediente activo em combinação com um transportador farmaceuticamente aceitável.

#### IV. Terapia de combinação

Em determinadas concretizações, os usos aqui proporcionados para eliminar o crescimento de células de cancro da mama TN ou para tratar um doente com tumor da mama TN, tal como um tumor da mama TN BL, pode compreender administração do inibidor de ErbB3 e de pelo menos um agente anti-cancro adicional que não é um inibidor de ErbB3.

Numa concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende pelo menos um fármaco quimioterapêutico. Os exemplos não limitantes de tais fármacos quimioterapêuticos incluem fármacos de quimioterapia baseados em platina (*e.g.* cisplatina, carboplatina), taxanos (*e.g.*, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), EndoTAG-1™ (uma formulação de paclitaxel encapsulado em complexos baseados em lípidos carregados positivamente; MediGene), Abraxane® (uma formulação de

paclitaxel ligado a albumina)), inibidores de tirosina cinase (e.g., imatinib/Gleevec®, sunitinib/Sutent®, dasatinib/Sprycel®) e suas combinações.

Noutra concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende um inibidor de EGFR, tal como um anticorpo anti-EGFR ou uma molécula pequena inibidora de sinalização de EGFR. Um exemplo de anticorpo anti-EGFR é cetuximab (Erbitux®). Cetuximab está disponível comercialmente de ImClone Systems Incorporated. Outros exemplos de anticorpos anti-EGFR incluem matuzumab (EMD72000), panitumumab (Vectibix®; Amgen); nimotuzumab (TheraCIM™) e mAb 806. Um exemplo de molécula pequena inibidora da via de sinalização de EGFR é gefitinib (Iressa®), que está disponível comercialmente de AstraZeneca e Teva. Outros exemplos de moléculas pequenas inibidoras da via de sinalização de EGFR incluem erlotinib HCL (OSI-774; Tarceva®, OSI Pharma); lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline); canertinib (dicloridrato de canertinib, Pfizer); pelitinib (Pfizer); PKI-166 (Novartis); PD158780; e AG 1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina).

Ainda noutra concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende um inibidor de VEGF. Um exemplo de inibidor de VEGF compreende um anticorpo anti-VEGF, tal como bevacizumab (Avastatin®; Genentech).

Ainda noutra concretização, o pelo menos um agente anti-cancro adicional compreende um anticorpo anti-ErbB2. Os anticorpos anti-ErbB2 adequados incluem trastuzumab e pertuzumab.

Num aspecto, a eficácia melhorada de uma combinação de acordo com a invenção pode ser demonstrada conseguindo sinergia terapêutica.

A expressão “sinergia terapêutica” é usada quando a combinação de dois produtos a determinadas doses é mais eficaz do que o melhor dos dois produtos sozinho às mesmas doses. Num exemplo, a sinergia terapêutica pode ser avaliada por comparação de uma combinação com o melhor agente sozinho, usando estimativas obtidas de uma análise bidireccional de variância

com medições repetidas (e.g., factor tempo) do parâmetro volume de tumor.

A expressão "aditivo" refere-se à combinação de dois ou mais produtos a determinadas doses que é igualmente eficaz à soma das eficárias obtidas com cada um dos dois ou mais produtos, enquanto a expressão "superaditivo" refere-se à combinação que é mais eficaz do que a soma das eficárias obtidas com cada um dos dois ou mais produtos.

Outra medida pela qual se pode quantificar a eficácia (incluindo a eficácia de combinações) é pelo cálculo do  $\log_{10}$  da morte celular, que é determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\log_{10} \text{morte celular} = T - C(\text{dias}) / 3,32 \times T_d$$

no qual  $T-C$  representa o atraso no crescimento das células, que é o tempo médio, em dias, para os tumores do grupo tratado ( $T$ ) e os tumores do grupo de controlo ( $C$ ) atingirem um valor pré-determinado (1 g ou 10 mL, por exemplo) e  $T_d$  representa o tempo, em dias, necessário para o volume do tumor duplicar nos animais de controlo. Quando se aplica esta medição, considera-se que um produto é activo quando  $\log_{10}$  morte celular é igual ou superior a 0,7 e considera-se que um produto é muito activo quando  $\log_{10}$  morte celular é superior a 2,8.

Usando esta medida, uma combinação, usada na sua dose máxima tolerada, na qual cada um dos constituintes está presente a uma dose geralmente igual ou inferior à sua dose máxima tolerada, apresenta sinergia terapêutica quando  $\log_{10}$  morte celular é maior do que o valor de  $\log_{10}$  morte celular do melhor constituinte quando administrado sozinho. Num caso exemplo, o valor de  $\log_{10}$  morte celular da combinação é superior ao valor de  $\log_{10}$  morte celular do melhor constituinte da combinação em pelo menos uma unidade de log morte celular.

### Exemplos

#### **Exemplo 1: Efeitos de MM-121 em xeno-enxerto de cancro da mama humano triplo negativo MAXF499**

Efectua-se uma análise da eficácia anti-tumor e tolerância do tratamento com MM-121 de ratinhos com tumor usando xeno-enxerto de cancro da mama humano triplo negativo MAXF499 (ONCOTEST GmbH, Friburgo, Alemanha) em ratinhos nus NMRI. MAXF449 é um explante de tumor humano (descrito histologicamente após explante como um ducto invasivo sólido, fracamente definido) estabelecido por injecção subcutânea em passagem em série em ratinhos nus. As células MAXF449 usadas nestas experiências foram passadas 22 vezes. Os ratinhos nus NMRI foram obtidos do criador Taconic, Charles River Laboratories International ou Harlan Laboratories. Os ratinhos foram mantidos em jaulas (IVC) de policarbonato ventiladas individualmente em Tecniplast (Macrolon) dentro de quartos de ambiente controlado e tiveram livre acesso a alimento e água acidificada.

Para investigar a eficácia anti-tumor em monoterapia, administra-se MM-121 ou controlo de veículo (100 µL) a ratinhos com tumor a 600 µg por ratinho (MM-121 como uma solução a 6 mg/mL em PBS) por injecção IP de três em três dias. Os ratinhos de controlo recebem apenas veículo PBS. Determina-se a eficácia por comparação do crescimento de tumor entre os ratinhos tratados com anticorpo e ratinhos tratados com controlo de veículo e expressa-se como a razão experimental entre a mediana dos volumes de tumor e o controlo (valor T/C). Um valor de T/C mínimo inferior a 50% é um pré-requisito para considerar um tratamento eficaz. Os grupos de controlo e experimental contêm cada qual 10 ratinhos com um tumor cada. Para obter 30 ratinhos com tumores de tamanhos semelhantes para distribuição aleatória, implantam-se 40 ratinhos por tumor unilateralmente.

Os ratinhos são distribuídos aleatoriamente e inicia-se a terapia quando um número suficiente de tumores individuais cresceram até um volume de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Medem-se os tumores (C x L) por medição com craveira digital e calcula-se o volume do tumor usando a fórmula  $\pi/6 (C^2 \times L)$ . A primeira

dose é administrada no dia 0 (dia da distribuição aleatória) ou um dia mais tarde.

Aproximadamente 24 horas após administração da dose final todos os ratinhos são sangrados para preparar soro; adicionalmente, recolhem-se os tumores dos mesmos ratinhos para congelamento flash e FFPE (1/2 tumor cada).

De acordo com a regulamentação de experiências com animais, os ratinhos são sacrificados caso o volume de tumor exceda 1800 mm<sup>3</sup> (um tumor por ratinho). Os ratinhos são monitorizados e doseados até os seus tumores crescerem até esse tamanho, mas não mais de 60 dias. Seguidamente são sacrificados para recolha de amostras.

No final do estudo, aproximadamente 24 horas após administração da dose final, todos os ratinhos no estudo são sangrados sublingualmente para obter a quantidade máxima de sangue para a preparação de soro. Divide-se o soro em alíquotas em 2 tubos com aproximadamente 250 µL em cada.

Adicionalmente, excisaram-se os tumores de todos os ratinhos imediatamente para congelamento rápido em azoto líquido (1/2 tumor, proporcionam-se sacos COVARIS para o armazenamento de amostras) e para fixação em formalina tamponada a 10% durante <24 horas, desidratação subsequente e embebimento em parafina (FFPE, 1/2 tumor).

Mediram-se os pesos dos animais e os diâmetros dos tumores (L e C) duas vezes por semana e calculam-se os volumes de tumor usando a fórmula  $\pi/6 (L^2 \times C)$ . Representam-se graficamente as curvas de crescimento de tumor. Calcula-se a inibição de tumor e o atraso de crescimento absoluto para 2 e 4 tempos de duplicação.

Apresentam-se na figura os resultados de experiências que são efectuadas substancialmente como descrito. O tratamento com MM-121 inibiu ou parou o crescimento de tumor e, em alguns casos, reduziu o tamanho do tumor. A TGI (inibição de crescimento de tumor) nestes xeno-enxertos de tumor humano triplo negativo foi calculada como aproximadamente 200%.

**Exemplo 2: Efeitos de MM-121 em xeno-enxerto de cancro da mama humano triplo negativo MDA-MB-231**

Injectaram-se ratinhos nus Balb/c sob anestesia geral com  $10^7$  células de cancro da mama humano triplo negativo MDA-MB-231 (ATCC) quer subcutaneamente no flanco ou na gordura mamária. Os ratinhos com tumores estabelecidos (i.e. após 7-10 dias de crescimento de tumor após injecção de células) foram então tratados IP com PBS ou MM-121 de três em três dias com 600 ug de MM-121 por ratinho, tal como descrito no exemplo 1. Mediúse o volume de tumor duas vezes por semana, tal como descrito no exemplo 1.

Os resultados das experiências efectuadas substancialmente como descrito são apresentados na figura 2. O tratamento com MM-121 parou o crescimento de tumor de cancro da mama humano triplo negativo de um modo essencialmente completo nestas experiências.

**Exemplo 3: Medição da afinidade de ligação ( $K_D$ )**

As constantes de dissociação de anticorpos anti-ErbB podem ser medidas usando uma de duas técnicas independentes ou ambas, um ensaio de ressonância plasmónica de superfície e um ensaio de ligação celular.

Ensaio de ressonância plasmónica de superfície

O ensaio de ressonância plasmónica de superfície é efectuado tal como descrito em Wassaf et al. (2006) *Analytical Biochem.*, 351:241-253. Uma implementação usa um instrumento BIACORE 3000 (GE Healthcare) usando uma proteína ErbB3 recombinante como analito e o anticorpo anti-ErbB3 como o ligando. O valor de  $K_D$  é calculado com base na fórmula  $K_D = K_d/K_a$ .

Ensaio de ligação celular

Efectua-se um ensaio de ligação celular usando células MALME-3M (ATCC) para ligação de ErbB3. O ensaio efectua-se substancialmente da seguinte forma.

Destacam-se as células com 2 mL tripsina-EDTA + 2 mL RMPI + EDTA 5mM à temperatura ambiente durante 5 minutos. Adiciona-se RPMI completo (10 mL) imediatamente às células tripsinizadas, ressuspende-se suavemente e centrifugam-se em centrífuga de bancada Beckman a 1100 rpm durante 5 minutos. Ressuspendem-se as células em tampão de coloração BD (PBS + FBS a 2% + azida de sódio a 0,1%, Becton Dickinson) a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por ml e plaqueiam-se alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^5$  células) numa placa de titulação de 96 poços.

Prepara-se 150  $\mu\text{l}$  de solução de anticorpo anti-ErbB 200 nM em tampão de coloração BD e dilui-se em série duas vezes para 75  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD. As concentrações do anticorpo diluído estavam na gama de 200 nM a 0,4 nM. Seguidamente adicionam-se alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  das diferentes diluições de proteína directamente aos 50  $\mu\text{l}$  de suspensão celular, obtendo-se concentrações finais de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12 nM, 6 nM, 3 nM, 1,5 nM, 0,8 nM, 0,4 nM e 0,2 nM do anticorpo.

Incubam-se as células em alíquotas na placa de 96 poços com as diluições de proteína durante 30 minutos à temperatura ambiente num agitador de plataforma e lavam-se 3 vezes com 300  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD. Incubam-se então as células com 100  $\mu\text{l}$  de anticorpo secundário (e.g., uma diluição 1:750 de IgG de cabra anti-humano marcado com Alexa 647 em tampão de coloração BD) durante 45 minutos num agitador de plataforma na sala fria. Finalmente, lavam-se as células duas vezes, sedimentam-se e ressuspenderem-se em 250  $\mu\text{l}$  de tampão de coloração BD + iodeto de propídio a 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Efectua-se análise de 10000 células num citómetro de fluxo FACSCALIBUR usando o canal FL4. Os valores de MFI e as concentrações correspondentes do anticorpo anti-ErbB são representados graficamente no eixo dos y e no eixo dos x, respectivamente. Determina-se o  $K_D$  da molécula usando o utilitário GraphPad PRISM usando o modelo de ligação de um local para uma curva de regressão não linear.

O valor de  $K_D$  é calculado com base na fórmula  $Y=B_{max} * X / K_D + X$  ( $B_{max}$  = fluorescência na saturação.  $X$  = concentração de anticorpo.  $Y$  = grau de ligação).

**Exemplo 4: Inibição do crescimento de tumor *in vivo* pelo tratamento de combinação com MM-121 e paclitaxel**

Métodos:

Implantaram-se ortotopicamente ratinhos nus Balb/c (fêmeas, 4-5 semanas de idade de Charles River lab) com  $10 \times 10^6$  célula na gordura mamária. Deixaram-se os tumores atingir uma média de tamanho de  $100 \text{ mm}^3$  antes de distribuição aleatória em 4 grupos de 10 ratinhos, contendo ratinhos com uma distribuição de tamanho de tumores similar. Tratou-se cada grupo de ratinhos com 1) MM-121 (150 ug/ratinho, ip., Q3D) ou 2) controlo de veículo (PBS, ip.) ou 3) paclitaxel (5 mg/kg LC Labs) ou 4) paclitaxel (5 mg/kg) e MM-121 (150 ug/ratinho). Continuou-se o tratamento durante 4 semanas. Medem-se os tumores duas vezes por semana e calcula-se o volume de tumor como  $\frac{\pi}{6} \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$ , em que a largura é a medição mais curta.

Resultados:

Investigou-se a combinação de MM-121 com paclitaxel *in vivo* no modelo de xenoenxerto de cancro da mama triplo negativo MDA-MB-231 usando os métodos descritos anteriormente ou com pequenas variações. Trataram-se os ratinhos com doses sub-óptimas de MM-121, paclitaxel, uma combinação de MM-121 e paclitaxel ou controlo de veículo (figura 3). Enquanto tanto MM-121, como paclitaxel individualmente inibiram o crescimento de tumor *in vivo*, os ratinhos que receberam uma terapia de combinação de MM-121 e paclitaxel apresentaram uma melhoria da inibição do crescimento de tumor comparativamente ao obtido com cada um dos tratamentos individuais. A melhoria da inibição de crescimento de tumor apresentou sinergia terapêutica e foi pelo menos cerca de aditiva comparativamente à melhoria obtida com cada um dos agentes individuais da combinação.

A tabela 1 apresenta os dados usados para preparar a figura 3. A tabela 2 apresenta a % de alteração média dos volumes de tumor usando dados das mesmas experiências da figura 3, normalizados para o volume de tumor inicial.

**TABELA 1:** dados usados para preparar a figura 3 - volumes médios de tumor em mm<sup>3</sup>

<b>Veículo</b>	<b>Média</b>	<b>104,4</b>	<b>137,1</b>	<b>144,5</b>	<b>229,5</b>	<b>253,7</b>	<b>291,0</b>
<b>MM121 150 µg</b>	<b>Média</b>	<b>99,4</b>	<b>115,5</b>	<b>137,5</b>	<b>180,4</b>	<b>187,2</b>	<b>242,7</b>
<b>paclitaxel 5 mg/kg</b>	<b>Média</b>	<b>97,9</b>	<b>113,5</b>	<b>144,6</b>	<b>166,2</b>	<b>178,8</b>	<b>202,2</b>
<b>MM121 150 µg + paclitaxel 5 mg/kg</b>	<b>Média</b>	<b>96,2</b>	<b>100,8</b>	<b>98,3</b>	<b>104,1</b>	<b>113,0</b>	<b>121,6</b>

**Exemplo 5: Combinação de MM-121 com quimioterapias dirigidas *in vivo***

Métodos:

Implantaram-se ortotopicamente ratinhos nus Balb/c (fêmeas, 4-5 semanas de idade de Charles River lab) com  $10 \times 10^6$  células na gordura mamária. Deixaram-se os tumores atingir uma média de tamanho de 150 mm<sup>3</sup> antes de distribuição aleatória em 9 grupos de 8 ratinhos, contendo ratinhos com uma distribuição de tamanhos de tumor similar. Cada grupo de ratinhos é tratado com uma dose de 1) MM-121 (300 ug/ratino, ip., Q3D) ou 2) controlo de veículo (PBS, ip.) ou 3) paclitaxel (10 mg/kg LC Labs) ou 4) erlotinib (50 mg/kg PO 5XQD) ou 5) cetuximab (2 mg/kg Q3D) ou terapia de combinação com: 6) erlotinib (50 mg/kg) e MM-121 (300 ug/ratino) ou 7) cetuximab (2 mg/kg) e MM-121 (300 ug/ratino) ou 8) erlotinib (50 mg/kg) e MM-121 (300 ug/ratino) e paclitaxel (10 mg/kg) ou 9) cetuximab (2 mg/kg) e MM-121 (300 ug/ratino) e paclitaxel (10 mg/kg). Continua-se o tratamento durante 4 semanas. Medem-se os tumores duas vezes por semana e calcula-se o volume de tumor como  $\frac{1}{6} \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$ , em que a largura é a medição mais curta.

**Resultados:** De modo a avaliar a eficácia de MM-121 para inibir crescimento de tumor quando usado em combinação com outros agentes, estas combinações foram ensaiadas *in vivo* no modelo de xeno-enxerto de cancro da mama triplo negativo MDA-MB-231 usando os métodos descritos anteriormente ou com pequenas variações. Trataram-se os ratinhos com MM-121 (administrado a doses sub-óptimas nas combinações), cetuximab, paclitaxel, MM-121 e cetuximab e a combinação tripla de MM-121 e cetuximab e

paclitaxel. Tal como apresentado na figura 4A, a terapia de combinação com MM-121 e cetuximab inibiu o crescimento de tumor em maior extensão do que qualquer dos agentes sozinhos e essencialmente parou o crescimento de tumor pelo menos até ao dia 39. A menor taxa de crescimento apresentou sinergia terapêutica e, em determinados casos, representou pelo menos cerca de uma diminuição aditiva da diminuição de crescimento comparativamente com a diminuição das taxas de qualquer das terapias simples. A adição de paclitaxel não aumentou o efeito de MM-121 e cetuximab. Os ratinhos foram então tratados com MM-121, erlotinib MM-121 e erlotinib ou a combinação tripla de MM-121 e erlotinib e paclitaxel. Tal como apresentado na figura 4B, MM-121 em combinação com erlotinib não teve um efeito estatisticamente significativo na taxa de crescimento de tumor comparativamente com o tratamento com qualquer dos agentes sozinhos. Contrariamente, o tratamento com a combinação tripla de MM-121, erlotinib e paclitaxel resultou numa diminuição nítida da taxa de crescimento de tumor e essencialmente parou o crescimento de tumor pelo menos até ao dia 39. A menor taxa de crescimento apresentou sinergia terapêutica e, em determinados casos, representou pelo menos cerca de uma diminuição aditiva do crescimento comparativamente à diminuição das taxas obtidas com qualquer das terapias simples ou duplas.

A tabela 3 apresenta os dados usados para preparar as figuras 4A e 4B. A tabela 4 apresenta a % de alteração média do volume de tumor usando os dados das mesmas experiências apresentados nas figuras 4A e 4B, normalizados para o volume de tumor inicial.

**TABELA 2.** Dados usados para preparar as figuras 4A e 4B – volumes médios de tumor em mm<sup>3</sup>.

<b>Dia</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>39</b>	<b>43</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>53</b>
<b>PBS</b>	163,7	199,0	242,8	304,5	369,4	423,4	458,4	490,7
<b>MM121 300 ug</b>	178,6	197,3	219,1	257,8	269,4	291,4	351,3	425,0
<b>erlotinib 50 mg/kg</b>	172,1	182,1	216,1	273,2	252,8	245,6	303,1	327,4
<b>cetuximab 2 mg/kg</b>	172,4	210,6	245,0	269,2	296,3	279,7	283,5	358,1
<b>MM121 + erlotinib</b>	170,6	215,5	221,8	261,7	272,5	255,3	305,2	378,3
<b>paclitaxel 10 mg/kg</b>	155,2	167,0	182,4	216,6	228,1	247,0	292,6	383,5
<b>MM121 + cetuximab</b>	152,5	149,6	171,6	169,1	196,6	171,2	182,9	241,2
<b>MM121 + erlotinib + paclitaxel</b>	164,8	149,3	139,8	146,5	156,7	163,4	202,9	264,5
<b>MM121 + cetuximab + paclitaxel</b>	176,3	158,5	147,8	160,4	154,4	163,4	203,4	247,7

#### Equivalentes

Os peritos na especialidade reconhecerão, ou serão capazes de avaliar usando apenas experiências de rotina, muitos equivalentes de concretizações específicas aqui descritas. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos pelas reivindicações seguintes. Quaisquer combinações das concretizações divulgadas nas reivindicações em anexo são abrangidas pelo âmbito da invenção.

### SUMÁRIO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Sequência de aminoácidos de V<sub>H</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISSSGG  
WTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQ  
GTLVTVSS

Sequência de aminoácidos DE V<sub>L</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSG  
VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGTKVTVL

CDR1 de V<sub>H</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:3)

HYVMA

CDR2 de V<sub>H</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:4)

SISSSGGWTLYADSVKG

CDR3 de V<sub>H</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:5)

GLKMATIFDY

CDR1 de V<sub>L</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:6)

TGTSSDVGSYNVVS

CDR2 de V<sub>L</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:7)

EVSQRPS

CDR3 de V<sub>L</sub> de MM-121 (SEQ ID NO:8)

CSYAGSSIFVI

Sequência de aminoácidos de V<sub>H</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGG  
ATRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDVWGQ  
GTLVTVSS

sequênciade aminoácidos de V<sub>L</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:10)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSDSNIGRNYIYWYQQFPGTAPKLLIYRNNQRPSG  
VPDRISGSKSGTSASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

CDR1 de V<sub>H</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:11)

AYNMR

CDR2 de V<sub>H</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:12)

VIYPSGGATRYADSVKG

CDR3 de V<sub>H</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:13)

GYYYYYGMDV

CDR1 de V<sub>L</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:14)

SGSDSNIGRNYIY

CDR2 de V<sub>L</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:15)

RNNQRPS

CDR3 de V<sub>L</sub> de Ab nº 3 (SEQ ID NO:16)

GTWDDSLSGPV

Sequência de aminoácidos de V<sub>H</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPSGG  
HTKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLLVDAFDIW  
GQGTMVTVSS

Sequência de aminoácidos de V<sub>L</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO: 18)

QYELTQPPSVSVPQQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLVMYKDKRGPSEI  
PERFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSTSYYVFGTGTKVTVL

CDR1 de V<sub>H</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:19)

AYGMG

CDR2 de V<sub>H</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:20)

YISPSGGHTKYADSVKG

CDR3 de V<sub>H</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:21)

VLETGLLVDAFDI

CDR1 de V<sub>L</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:22)

SGDQLGSKFVS

CDR2 de V<sub>L</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:23)

YKDKRRPS

CDR3 de V<sub>L</sub> de Ab nº 14 (SEQ ID NO:24)

QAWDSSTYV

Sequência de aminoácidos de V<sub>H</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:25)

EVQLLESGGIVQPGGSLRI.LSCAASGFTESWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPSGG  
ITVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDVWGQG  
TTVTVSS

Sequência de aminoácidos de V<sub>L</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:26)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSLNWYQQKPGKAPRLLIYDASNLETG  
VPPRFSGSGSGTDFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

CDR1 de V<sub>H</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:27)

WYGMG

CDR2 de V<sub>H</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:28)

YISPSGGITVYADSVKG

CDR3 de V<sub>H</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:29)

LNYYYGLDV

CDR1 de V<sub>L</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:30)

QASQDIGDSLN

CDR2 de V<sub>L</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:31)

DASNLET

CDR3 de V<sub>L</sub> de Ab nº 17 (SEQ ID NO:32)

QQSANAPFT

Sequência de aminoácidos de V<sub>H</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:33)EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWWVRQAPGKGLEWVSYIGSSGG  
PTYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDSWGQ  
GTLVTVSSSequência de aminoácidos de V<sub>L</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:34)QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGHWNIVSWYQQHPGKAPKLMITYDVSNRPS  
GVSNRF  
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWVFGGGTKLTVLCDR1 de V<sub>H</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:35)

RYGMW

CDR2 de V<sub>H</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:36)

YIGSSGGPTYYVDSVKG

CDR3 de V<sub>H</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:37)

GRGTPYYFDS

CDR1 de V<sub>L</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:38)

TGTSSDIGHWNIVS

CDR2 de V<sub>L</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:39)

DVSNRPS

CDR3 de V<sub>L</sub> de Ab nº 19 (SEQ ID NO:40)

SSYTSSSTWV

ErbB3 (SEQ ID NO:41)

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLS  
FLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHAL  
RQLRLTQLTEILSGCVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVDRDAEIVVKDNGRSCPPCHE  
VCKGRCWGPSEDCTLTKTICAPQCNGHCFGPNNQCCHECAGGCSGPQDTDCF  
ACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTS  
CVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSRSFQTVDSSNIDGFVNCTK  
ILGNLDLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFVFSN  
LTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTK  
VLRGPTEERLDIHKHRP RDCVAEGKVCDCPLCSSGGCWGP GPQCLSCRNYSRGGV  
CVTHCNFLNGEPREFAHEAECSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPH  
CVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPEI QDCLGQTLVLI GKT  
LTMALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANK  
VLARIFKETELRKLKVLCGVFGTVHKGVWIPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVT  
DHMLAIGSLDHAHVRLGLCPGSSLQLVTQYLPLGSLLDHVRQH RGALGPQLLL NW  
GVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLL YS  
EAKTPIKWMALESIHFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVPDLLE  
KGERLAQPQICTIDVYVMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLV KRES  
GPGIAPGPEPHGLTNKKLEEVELEPELDLDDLEAEEDNLATTLSALS LPVGT LNR  
PRGSQSLLSPSSGYMPMNQGNLGESCQESAVGSSERCPRVSLHPMPRGCLAS ESE  
GHVIGSEAEHQEKVSMCRSRSSRSPRPGDSAYHSQRHSLLTPV TPLSPPGLEEE DV  
NGYVMPDTHLKGT PSSREGTLSSVGLSSV LGTEEEDEDEEY EY MNRRRRHSPPH PPR  
PSSLEELGYEYMDVGSDLSASLGSTQSCP LHP VPIMPTAGTT PDEDYEY MNR QRD GG  
GPGGDY AAMGACPASEQGYEEMRAFQGP GHQAPHVHYARL KTL RSLEAT DSAFD N  
PDYWH SRLFPKANAQRT

Lisboa, 2015-04-13

REIVINDICAÇÕES

1. Inibidor de ErbB3 para uso num método de tratamento de cancro da mama triplo negativo, em que o inibidor é um anticorpo anti-ErbB3.

2. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo anti-ErbB3 comprehende, na ordem do terminal amino para o terminal carboxilo, uma sequência CDR1 de  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:3, uma sequência CDR2 de  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:4 e uma sequência CDR3 de  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:5 e, na ordem do terminal amino para o terminal carboxilo, uma sequência CDR1 de  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:6, uma sequência CDR2 de  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:7 e uma sequência CDR3 de  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:8.

3. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo anti-ErbB3 é seleccionado de:

(a) um anticorpo comprendendo uma sequência  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:1 e uma sequência  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:2;

(b) um anticorpo comprendendo uma sequência  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:9 e uma sequência  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:10;

(c) um anticorpo comprendendo uma sequência  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:17 e uma sequência  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:18; e

(d) um anticorpo comprendendo uma sequência  $V_H$  tal como apresentada em SEQ ID NO:25 e uma sequência  $V_L$  tal como apresentada em SEQ ID NO:26.

4. Inibidor para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o tumor de cancro da mama triplo negativo é caracterizado histopatologicamente como tendo:

- (i) um fenótipo do tipo basal; ou
- (ii) um fenótipo diferente do tipo basal.

5. Inibidor para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o método comprehende adicionalmente administrar pelo menos um agente anti-cancro adicional.

6. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 5, em que o agente anti-cancro adicional não é um inibidor de ErbB3.

7. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o pelo menos um agente anti-cancro adicional é seleccionado de fármacos de quimioterapia baseados em platina, taxanos, inibidores de tirosina cinase, anticorpos anti-EGFR, anticorpos anti-ErbB2, suas combinações, inibidores de EGFR e inibidores de VEGF.

8. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 7, em que o pelo menos um agente anti-cancro adicional é paclitaxel.

9. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 7, em que o pelo menos um agente anti-cancro adicional é um anticorpo anti-EGFR.

10. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo anti-EGFR é seleccionado de cetuximab, matuzumab, panitumumab, nimotuzumab e mAb 806.

11. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 7, em que o inibidor de EGFR é um inibidor de sinalização de EGFR que é uma molécula pequena, seleccionado de gefitinib, lapatinib, canertinib, pelitinib, erlotinib HCL, PKI-166, PD158780 e AG 1478.

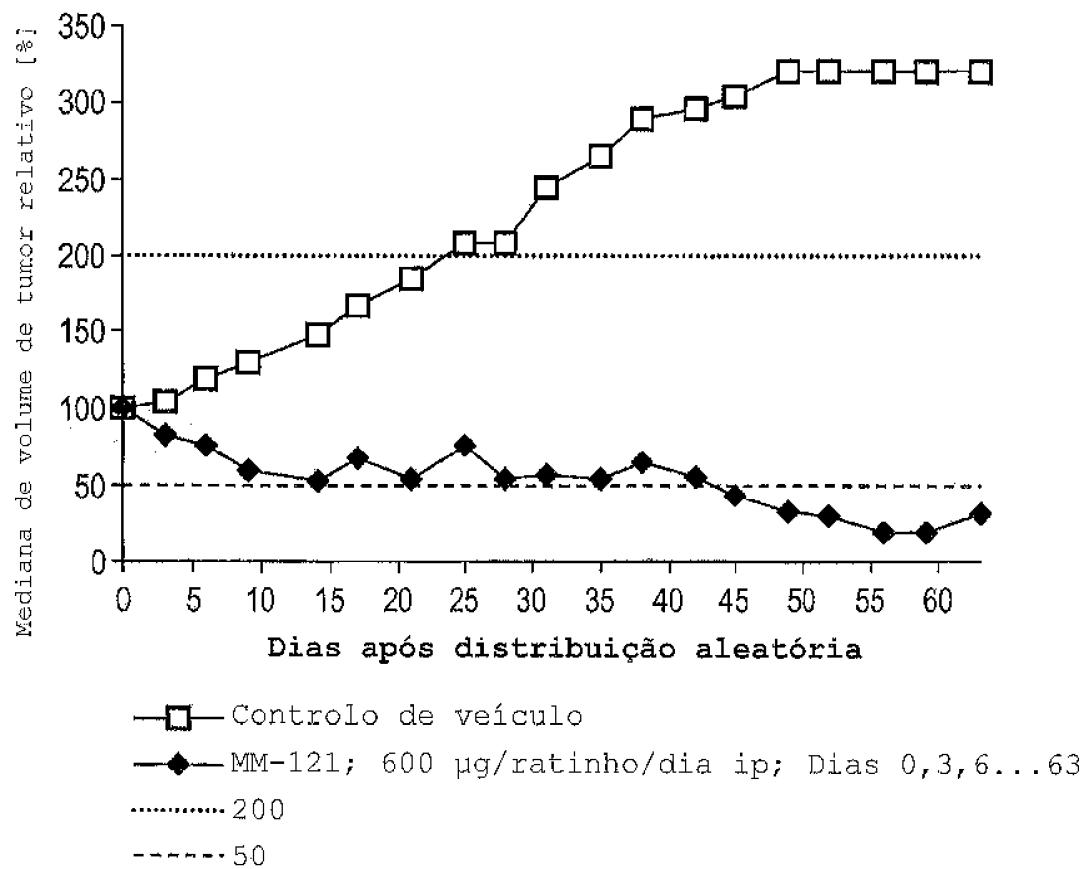
12. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 7, em que o inibidor de VEGF comprehende bevacizumab.

13. Inibidor para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o tumor de cancro da mama triplo negativo é um tumor no qual as células de tumor têm pontuação negativa para receptor de estrogénio (ER) e receptor de progesterona e têm um resultado de teste de 0, 1+ ou 2+ usando um ensaio imuno-histoquímico semi-quantitativo, usando um anticorpo primário policlonal anti-HER2.

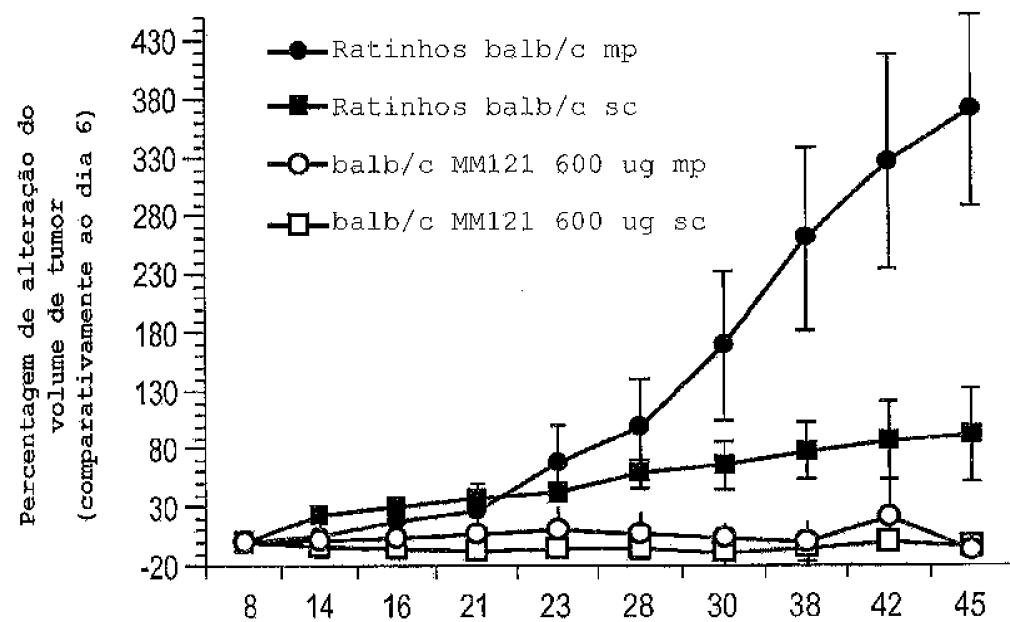
14. Inibidor para uso de acordo com a reivindicação 13, em que as células de tumor são negativas em FISH para amplificação do gene HER2.

15. Uso de um inibidor de ErbB3 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro da mama triplo negativo, em que o inibidor é um anticorpo contra ErbB3.

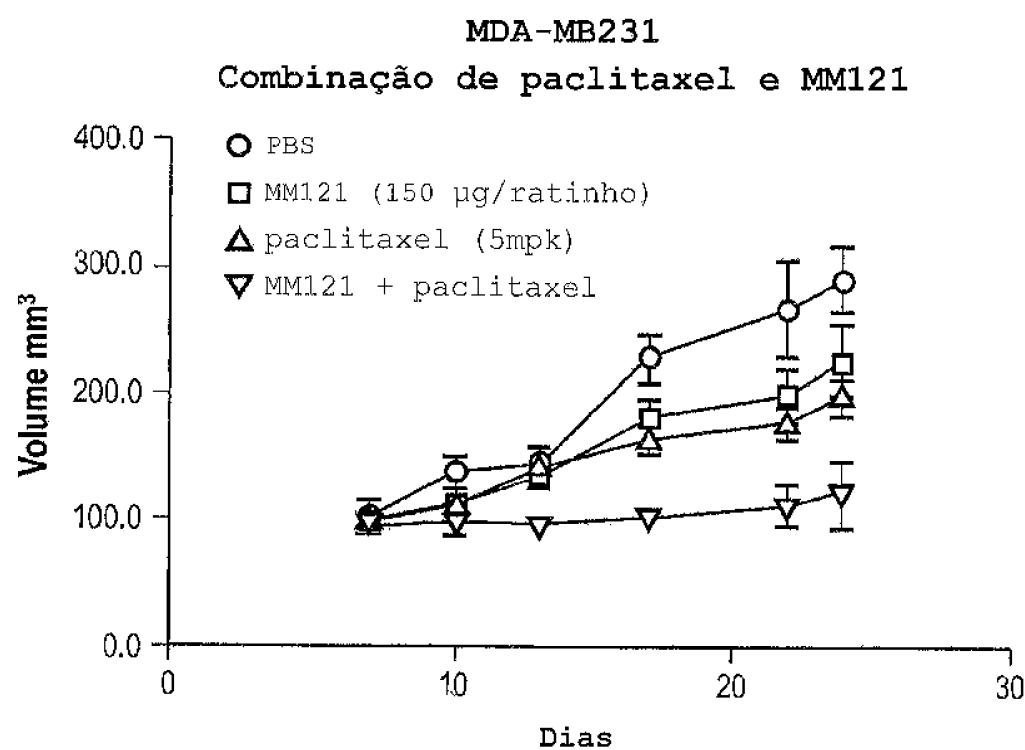
Lisboa, 2015-04-13



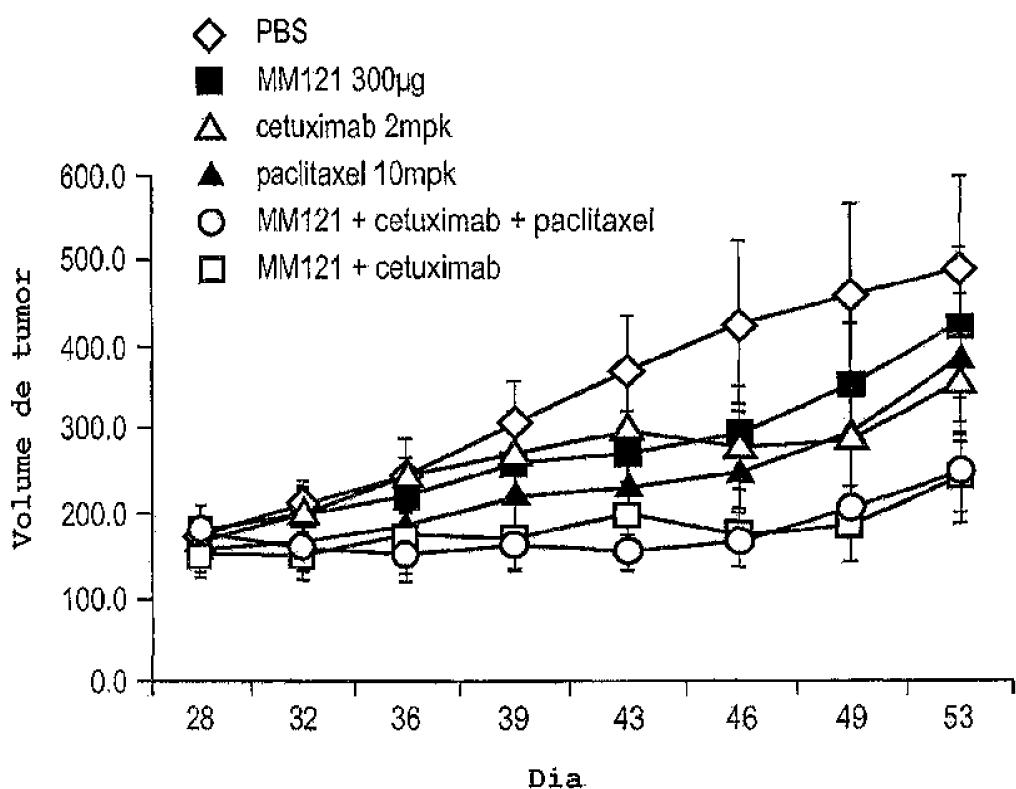
**Fig. 1**

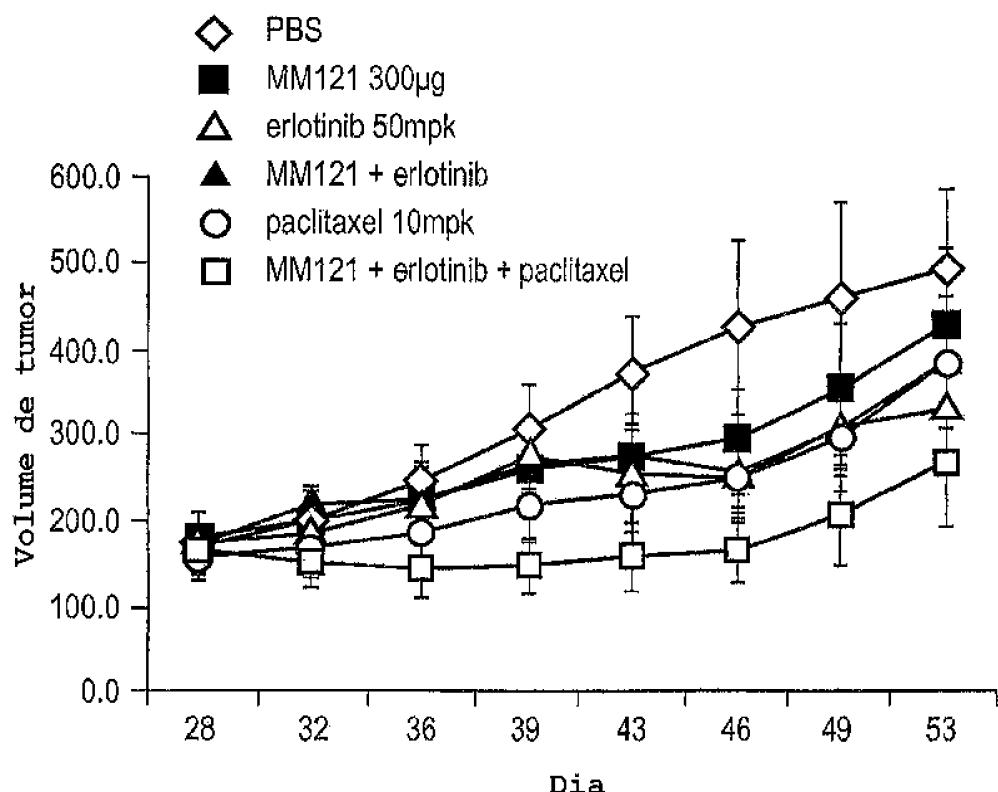


*Fig. 2*



***Fig. 3***

**MDA MB231\_MM121 + cetuximab + paclitaxel****Fig. 4A**

**MDA MB231 MM121 + erlotinib + paclitaxel****Fig. 4B**