



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0905733-1 B1



(22) Data do Depósito: 28/01/2009

(45) Data de Concessão: 24/09/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/32; C07K 16/06; C07K 1/18; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 30/01/2008 US 61/024,825.

(73) Titular(es): GENENTECH, INC..

(72) Inventor(es): REED J. HARRIS; PAUL A. MOTCHNIK.

(86) Pedido PCT: PCT US2009032220 de 28/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/099829 de 13/08/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/07/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER POSITIVO PARA HER2, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção trata de uma composição que compreende espécies principais de anticorpo HER2 que se ligam ao domínio II e HER2 e variantes ácidas do mesmo é descrita. As formulações farmacêuticas que compreendem a composição, e usos terapêuticos para a composição também são revelados.

“COMPOSIÇÃO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório Nº U.S. 61/024825, depositado em 30 de janeiro de 2008, cuja descrição está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade para todos os fins.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere a uma composição que compreende uma espécie principal de anticorpo HER2 que liga ao domínio II de HER2, e variantes ácidas do mesmo. A presente invenção também se refere a formulações farmacêuticas que compreendem a composição, e usos terapêuticos para a composição.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

ANTICORPOS HER2

[003] A família HER de tirosina quinases receptoras é uma mediadora importante de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. A família receptora inclui quatro membros distintos incluindo o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB1, ou HER1), HER2 (ErbB2 ou p185^{neu}), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tyro2).

[004] O EGFR, codificado pelo gene *erbB1*, foi casualmente implicado na malignidade humana. Em particular, a expressão aumentada do EGFR foi observada em câncer de mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago bem como glioblastomas. A expressão aumentada do receptor EGFR é frequentemente associada à produção aumentada do ligante EGFR, fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), através das mesmas células de tumor resultando na ativação do receptor por via estimulatória autócrina.

Baselga e Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127 a 154 (1994). Anticorpos monoclonais direcionados contra do EGFR ou seus ligantes, TGF- α e EGF, foram avaliados como agentes terapêuticos no tratamento de tais malignidades. Ver, por exemplo, Baselga e Mendelsohn., *supra*; Masui *et al. Cancer Research* 44:1002 a 1007 (1984); e Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95:1897 a 1905 (1995).

[005] O segundo membro da família HER, p185^{neu}, foi originalmente identificado como o produto do gene transformador de neuroblastomas de ratos quimicamente tratados. A forma ativada do proto-oncogene *neu* resulta de uma mutação pontual (valina a ácido glutâmico) na região da transmembrana da proteína codificada. A amplificação do homólogo humano de *neu* é observada em cânceres de mama e ovário e correlaciona com uma prognose pobre (Slamon *et al., Science*, 235:177 a 182 (1987); Slamon *et al., Science*, 244:707 a 712 (1989); e Patente No. U.S. 4.968.603). Até hoje, nenhuma mutação pontual análoga àquela no proto-oncogene *neu* foi relatada para tumores humanos. A superexpressão do HER2 (frequentemente, mas não uniformemente, devido à amplificação de gene) também foi observada em outros carcinomas incluindo carcinomas do estômago, endométrio, glândula salivaria, pulmão, rim, cólon, tireóide, pâncreas e bexiga. Ver, dentre outros, King *et al., Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al., Lancet*: 1:765 a 767 (1986); Fukushige *et al., Mol Cell Biol.*, 6:955 a 958 (1986); Guerin *et al., Oncogene Res.*, 3:21 a 31 (1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81 a 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 a 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 a 257 (1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358 a 363 (1988); Williams *et al. Pathobiology* 59:46 a 52 (1991); e McCann *et al., Cancer*, 65:88 a 92 (1990). O HER2 pode ser superexpresso em câncer de

próstata (Gu *et al.* *Cancer Lett.* 99:185 a 9 (1996); Ross *et al.* *Hum. Pathol.* 28:827 a 33 (1997); Ross *et al.* *Cancer* 79:2162 a 70 (1997); e Sadasivan *et al.* *J. Urol.* 150:126 a 31 (1993)).

[006] Anticorpos direcionados contra os produtos de proteína de rato p185^{neu} e humano HER2 foram descritos. Drebin e colegas criaram anticorpos contra o produto de gene de rato *neu*, p185^{neu}. Ver, por exemplo, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695 a 706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277 a 290 (1991); e WO94/22478. Drebin *et al.* *Oncogene* 2:273 a 277 (1988) relata que misturas de anticorpos reativos com duas regiões distintas de p185^{neu} resultam em efeitos anti-tumor sinérgicos em células NIH-3T3 transformadas por *neu* implantadas em camundongos nus. Ver, também, Patente U.S. 5.824.311 emitida em 20 de outubro de 1998.

[007] Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) descreve a geração de um painel de anticorpos HER2 que foram caracterizados com o uso da linhagem de célula de tumor de mama humana SK-BR-3. A proliferação celular relativa das células SK-BR-3 seguindo a exposição aos anticorpos foi determinada por coloração cristal violeta das monocamadas após 72 horas. Com o uso deste ensaio, a inibição máxima foi obtida como anticorpo chamado 4D5 que inibiu a proliferação celular em 56%. Outros anticorpos no painel reduziram a proliferação celular a uma extensão menor neste ensaio. Encontrou-se, ainda, que o anticorpo 4D5 sensibiliza linhagens de célula de tumor de mama com superexpressão de HER2 para os efeitos citotóxicos de TNF- α . Ver também Patente No. U.S. 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 a 1558 (1990); Kotts *et al.* *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.* *Growth Regulation* 1:72 a 82 (1991); Shepard *et al.* *J. Clin. Immunol.* 11(3):117 a 127 (1991); Kumar *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979 a 986 (1991); Lewis *et al.* *Cancer*

Immunol. Immunother. 37:255 a 263 (1993); Pietras *et al.* *Oncogene* 9:1829 a 1838 (1994); Vitetta *et al.* *Cancer Research* 54:5301 a 5309 (1994); Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269(20):14661 a 14665 (1994); Scott *et al.* *J. Biol. Chem.* 266:14300 a 5 (1991); D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202 a 7206 (1994); Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457 a 1465 (1996); e Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385 a 1394 (1997).

[008] Uma versão humanizada recombinante do anticorpo HER2 murídeo 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab ou HERCEPTIN[®]; Patente No. U.S. 5.821.337) é clinicamente ativa em pacientes com cânceres de mama metastáticos com superexpressão de HER2 que receberam terapia anti-câncer extensiva anteriormente (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737 a 744 (1996)). O Trastuzumab recebeu aprovação mercadológica da Administração de Fármacos e Alimentos (Food e Drug Administration) em 25 de setembro de 1998 para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático cujos tumores superexpressam a proteína HER2.

[009] Outros anticorpos HER2 com várias propriedades foram descritos em Tagliabue *et al.* *Int. J. Cancer* 47:933 a 937 (1991); McKenzie *et al.* *Oncogene* 4:543 a 548 (1989); Maier *et al.* *Cancer Res.* 51:5361 a 5369 (1991); Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3:350 a 362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88:8691 a 8695 (1991); Bacus *et al.* *Cancer Research* 52:2580 a 2589 (1992); Xu *et al.* *Int. J. Cancer* 53:401 a 408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al.* *Cancer Research* 52:2771 a 2776 (1992); Hancock *et al.* *Cancer Res.* 51:4575 a 4580 (1991); Shawver *et al.* *Cancer Res.* 54:1367 a 1373 (1994); Arteaga *et al.* *Cancer Res.* 54:3758 a 3765 (1994); Harwerth *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:15160 a 15167 (1992); Patente No. U.S. 5.783.186; e Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099 a 2109 (1997).

[010] A triagem de homologia resultou na identificação de dois outros membros da família de receptores HER; HER3 (Patentes Nos. U.S.

5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193 a 9197 (1989)) e HER4 (Pedido de Patente No EP 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746 a 1750 (1993); e Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos esses receptores exibem expressão aumentada em pelo menos algumas linhagens de célula de câncer de mama.

[011] Os receptores HER são geralmente encontrados em várias combinações em células e acredita-se que a heterodimerização aumenta a diversidade de respostas celulares a uma variedade de ligantes HER (Earp *et al.* *Breast Cancer Research e Treatment* 35: 115 a 132 (1995)). O EGFR é ligado por seis ligantes diferentes; fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), anfiregulina, fator de crescimento epidérmico de ligação da heparina (HB-EGF), betacelulina e epiregulina (Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235 a 257 (1994)). Uma família de proteínas heregulinas resultante da combinação alternativa de um único gene é de ligantes para HER3 e HER4. A família heregulina inclui heregulinas alfa, beta e gama (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205 a 1210 (1992); Patente No. U.S. 5.641.869; e Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385 a 1394 (1997)); fatores de diferenciação de neu (NDFs), fatores de crescimento glial (GGFs); atividade de indução de receptor de acetilcolina (ARIA); e fator derivado de neurônio sensorio e motor (SMDF). Para uma revisão, ver Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235 a 257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247 a 262 (1996) e Lee *et al.* *Pharm. Rev.* 47:51 a 85 (1995). Recentemente, três ligantes HER adicionais foram identificados; neuregulina-2 (NRG-2) do qual se relatou que se liga a ou HER3 ou HER4 (Chang *et al.* *Nature* 387 509 a 512 (1997); e Carraway *et al.* *Nature* 387:512 a 516 (1997)); neuregulina-3 que se liga a HER4 (Zhang *et al.* *PNAS (USA)* 94(18):9562 a 7 (1997)); e neuregulina-4 que se liga a HER4 (Harari *et al.* *Oncogene* 18:2681 a 89 (1999)) HB-EGF, betacelulina e epiregulina também se ligam a HER4.

[012] Enquanto o EGF e o TGF α não se ligam a HER2, o EGF estimula o EGFR e o HER2 para formar um heterodímero, que ativa o EGFR e resulta em transfosforilação do HER2 no heterodímero. Dimerização e/ou transfosforilação parece ativar tirosina quinase de HER2. Ver Earp *et al.*, *supra*. Da mesma maneira, quando o HER3 é co-expresso com HER2, um complexo de sinalização ativa é formado e anticorpos direcionados contra HER2 são capazes de romper este complexo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661 a 14665 (1994)). Adicionalmente, a afinidade de HER3 com heregulina (HRG) é aumentada para um estado de afinidade mais alto quando co-expresso com HER2. Ver também, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329 a 1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); e Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457 a 1465 (1996) em relação ao complexo de proteína HER2-HER3. O HER4, como o HER3, forma um complexo de sinalização ativa com o HER2 (Carraway e Cantley, *Cell* 78:5 a 8 (1994)).

[013] Para direcionar a via de sinalização HER, o rhuMAb 2C4 (Pertuzumab) foi desenvolvido como um anticorpo humanizado que inibe a dimerização de HER2 com outros receptores HER, por meio disso inibindo a ativação e a fosforilação induzido por ligante, e a ativação a jusante das vias RAS e AKT. Em um teste de fase I do Pertuzumab como um agente único para o tratamento de tumores sólidos, 3 indivíduos com câncer de ovário avançado foram tratados com pertuzumab. Um teve uma resposta parcial durável, e um indivíduo adicional teve a doença estável por 15 semanas. Agus *et al.* *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 192, Abstract 771 (2003).

COMPOSIÇÕES DE VARIANTE DE ANTICORPO

[014] A Patente No. US 6.339.142 descreve uma composição do anticorpo HER2 que compreende uma mistura do anticorpo anti-HER2 e uma ou mais variantes ácidas do mesmo, em que a quantidade de variante(s)

ácida(s) é menor do que cerca de 25%. Trastuzumab é o anticorpo HER2 exemplificado.

[015] O pôster de Reid *et al.* apresentado na conferência Well Characterized Biotech Pharmaceuticals (Janeiro, 2003) “Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics” descreve uma composição de anticorpo IgG1 sem nome, humanizada com heterogeneidades de N-terminal devido a combinações de peptídeo de sinal VHS, glutamina de N-terminal, e ácido piroglutâmico na cadeia pesada do mesmo.

[016] A palestra por Harris *et al.* “The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method” apresentada na IBC Antibody Production Conference (Fevereiro, 2002) relata uma extensão VHS na cadeia pesada de E25, um anti-anticorpo IgE humanizado.

[017] O pôster de Rouse *et al.* apresentado na WCBP “‘Top Down’ Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry e Its Application to Biopharmaceutical Development” (6 a 9 de janeiro, 2004) descreve uma composição de anticorpo monoclonal com heterogeneidade de N-terminal resultante de resíduos de peptídeo sinal $^{-3}$ AHS ou $^{-2}$ HS na cadeia leve do mesmo.

[018] Em uma apresentação no Encontro IBC (setembro, 2000) “Strategic Use of Comparability Studies e Assays for Well Characterized Biologicals,” Jill Porter discutiu uma forma de eluição tardia de ZENAPAX_J com três resíduos de aminoácido extras na cadeia pesada do mesmo.

[019] US2006/0018899 descreve uma composição que compreende espécies principais de anticorpo pertuzumab e uma variante de extensão líder amino-terminal, bem como outras formas variantes do anticorpo pertuzumab.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[020] De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende uma espécie principal de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II do HER2, e variantes ácidas do mesmo, em que as variantes ácidas incluem variante glicada, variante dissulfeto reduzida, ou variante não-reduzível. Preferivelmente, as variantes ácidas incluem variante glicada, variante deamidada, variante de dissulfeto reduzida, variante sialilada, e variante não-reduzível. Desejavelmente, a quantidade de variantes ácidas é menor do que cerca de 25%.

[021] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição que compreende uma espécie principal de anticorpo HER2 que compreende sequências de variáveis leves e sequências de variáveis pesadas nas SEQ ID Nos. 3 e 4, respectivamente, e variantes ácidas da espécie principal de anticorpo, em que as variantes ácidas incluem variante glicada, variante deamidada, variante dissulfeto reduzida, variante sialilada, e variante não-reduzível.

[022] A presente invenção também diz respeito a formulações farmacêuticas que compreendem as composições em um veículo farmaceuticamente aceitável.

[023] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método de tratamento de câncer positivo para HER2 em um paciente que compreende a administração da formulação farmacêutica ao paciente em uma quantidade efetiva para tratar o câncer. Com relação a tais métodos, conforme demonstrado nos exemplos aqui descritos, preferivelmente as espécies principais de anticorpo e variantes ácidas têm, essencialmente, a mesma farmacocinética.

[024] Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um método para a produção de uma composição farmacêutica que compreende:

(1) preparar uma composição que compreende uma espécie principal de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II do HER2, e variantes ácidas do mesmo incluindo variante glicada, variante dissulfeto reduzida, ou variante não-reduzível, e

(2) avaliar as variantes ácidas na composição, e confirmar que a quantidade da mesma é menor que cerca de 25%. Em uma modalidade, as variantes ácidas são avaliadas por um método selecionado a partir do grupo que consiste em cromatografia de troca iônica, em que a composição é tratada com sialidase, eletroforese capilar reduzida com dodecil sulfato de sódio (CE-SDS), CE-SDS não reduzido, cromatografia de boronato e mapeamento de peptídeo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[025] A Figura 1 fornece um esquema da estrutura da proteína HER2, e sequências de aminoácido para os Domínios I-IV (SEQ ID Nos.19 a 22, respectivamente) do domínio extracelular dos mesmos.

[026] As Figuras 2A e 2B descrevem alinhamentos das sequências de aminoácido dos domínios de variável leve (V_L) (Fig. 2A) e variável pesada (V_H) (Figura 2B) de anticorpo monoclonal murídeo 2C4 (SEQ ID Nos. 1 e 2, respectivamente); domínios de V_L e V_H do 2C4 humanizado versão 574 (SEQ ID Nos. 3 e 4, respectivamente), e estruturas de consenso de V_L e V_H humanos (hum $\kappa 1$, subgrupo de kappa leve I; humIII, subgrupo pesado III) (SEQ ID Nos. 5 e 6, respectivamente). Asteriscos identificam as diferenças entre o 2C4 humanizado versão 574 e o anticorpo monoclonal murídeo 2C4 ou entre 2C4 humanizado versão 574 e a estrutura humana. Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) estão entre parênteses.

[027] As Figuras 3A e 3B mostram as sequências de aminoácido de Pertuzumab de cadeia leve (SEQ ID No. 15) e cadeia pesada (SEQ ID No. 16), respectivamente. As CDRs são mostradas em negrito. A porção de

carboidrato é fixada ao Asn 299 da cadeia pesada.

[028] As Figuras 4A e 4B mostram as sequências de aminoácido de Pertuzumab de cadeia leve (SEQ ID No. 17) e cadeia pesada (SEQ ID No. 18), respectivamente, cada um incluindo uma sequência de peptídeo de sinal de amino-terminal intacta.

[029] A Figura 5 descreve, de modo esquemático, a ligação do 2C4 no sítio de ligação heterodimérica do HER2, evitando, por meio disso, a heterodimerização com EGFR ativado ou HER3.

[030] A Figura 6 descreve o acoplamento do HER2/HER3 por vias MAPK e Akt.

[031] A Figura 7 mostra as estruturas de Trastuzumab e Pertuzumab e a Tabela A abaixo compara suas atividades.

TABELA A

Trastuzumab Herceptin	Pertuzumab Omnitarg
Liga-se em IV, próximo a JM	Liga-se em II na interface de dimerização
Protege contra o desprendimento do receptor	Não previne o desprendimento do receptor
Afeta moderadamente a diminuição da modulação do receptor	Afeta moderadamente a diminuição da modulação do receptor
Pequeno efeito sobre o papel de HER2 como um correceptor	Grande efeito sobre o papel de HER2 como um correceptor

[032] As Figuras 8A e 8B mostram as sequências de aminoácido do Trastuzumab de cadeia leve (SEQ ID No. 13) e cadeia pesada (SEQ ID No. 14), respectivamente.

[033] As Figuras 9A e 9B descrevem uma sequência da variante de Pertuzumab de cadeia leve (SEQ ID No. 23) e uma sequência da variante de Pertuzumab de cadeia pesada (SEQ ID No. 24).

[034] A Figura 10 mostra um projeto experimental para o isolamento de troca de cátion MP (Pico Principal) e AV (Variantes Ácidas), cultura de célula, recuperação, e avaliação e teste analítico de PK

(farmacocinéticos). Meios frescos= meios padrão; meios gastos= meios padrão após 12 dias de cultura de célula, as células foram removidas por centrifugação. Oxigênio dissolvido, pH, e outros parâmetros não foram controlados.

[035] A Figura 11 mostra um cromatograma de troca de cátion (CEX) DIONEX PROPAC™ típico do Exemplo 1.

[036] A Tabela B mostra uma análise do material de partida de pertuzumab e frações de CEX. AV = variante ácida; MP = pico principal; e BV = variante básica.

[037] A Figura 13 revela a CEX de pico principal (MP) adicionada em meios de cultura de célula e incubada por 12 dias.

[038] A Tabela C descreve condições de incubação de pico principal.

[039] A Tabela D resume os métodos para caracterização de variantes ácidas.

[040] A Figura 16 mostra a concentração de pertuzumab versus o tempo nos estudos de PK no Exemplo 1.

[041] A Tabela E fornece a área abaixo da curva (AUC) e razões da média geométrica do estudo de PK no Exemplo 1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

[042] O termo “espécies principais de anticorpo” refere-se, aqui, à estrutura de sequência de aminoácido de anticorpo em uma composição que é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição. Preferivelmente, as espécies principais de anticorpo são de um anticorpo HER2, como um anticorpo que se liga ao Domínio II do HER2, um anticorpo que inibe a dimerização do HER com mais eficácia do que p Trastuzumab, e/ou um anticorpo que se liga a um sítio de ligação heterodimérica do HER2. A

modalidade preferível aqui das espécies principais de anticorpo é um que compreende as sequências de aminoácido de variável leve e variável pesada nas SEQ ID Nos. 3 e 4, e mais preferivelmente compreende as sequências de aminoácido de cadeia pesada e de cadeia leve nas SEQ ID Nos. 15 e 16 (Pertuzumab).

[043] Um anticorpo de “variante de sequência de aminoácido” aqui é um anticorpo com uma sequência de aminoácido que difere das espécies principais de anticorpo. Ordinariamente, variantes de sequência de aminoácido irão possuir pelo menos cerca de 70% de homologia com as espécies principais de anticorpo, e preferivelmente, elas irão ser pelo menos cerca de 80%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% homólogas às espécies principais do anticorpo. As variantes de sequência de aminoácido possuem substituições, deleção, e/ou adições a certas posições dentro ou adjacente à sequência de aminoácido das espécies principais de anticorpo. Exemplos de variantes de sequência de aminoácidos aqui incluem uma variante ácida (por exemplo, uma variante de anticorpo diamidada), uma variante básica, o anticorpo com uma extensão líder amino-terminal (por exemplo, VHS-) ou uma ou duas cadeias leves do mesmo, um anticorpo com um resíduo lisina de C-terminal em uma ou duas cadeias pesadas do mesmo, um anticorpo com um ou mais resíduos de metionina oxidados, etc. e incluem combinações de variações às sequências de aminoácidos de cadeias pesada e/ou leve.

[044] Uma “variante ácida” é uma variante das espécies principais de anticorpo que é mais ácida do que as espécies principais de anticorpo. Uma variante ácida ganhou carga negativa ou perdeu carga positiva em relação às espécies principais de anticorpo. Tais variantes ácidas podem ser resolvidas com o uso de uma metodologia de separação, como cromatografia de troca iônica, que separa as proteínas de acordo com a carga.

Variantes ácidas de espécies principais de anticorpo eluem mais cedo do que o pico principal mediante a separação por cromatografia de troca catiônica.

[045] Uma “variante dissulfeto reduzida” tem uma ou mais cisteína(s) ligada(s) a dissulfeto quimicamente reduzidas para a forma livre tiol. Esta variante pode ser monitorada por cromatografia de interação hidrofóbica ou por metodologia de ajuste como Eletroforese Capilar com Sulfato de Dodecil Sulfato de Sódio (CE-SDS), por exemplo, conforme descrito no Exemplo 1. Aqui, uma “variante não reduzível” é uma variante das espécies principais de anticorpo que não pode ser quimicamente reduzido para cadeia pesada e leve por tratamento com um agente redutor como ditioneitol. Tais variantes podem ser avaliadas pelo tratamento da composição comum agente redutor e avaliação da composição resultante com o uso de uma metodologia que avalia o tamanho de proteína, como Eletroforese Capilar com Dodecil Sulfato de Sódio (CE-SDS), por exemplo, usando as técnicas descritas no Exemplo 1 abaixo.

[046] Um anticorpo de “variante de glicosilação” aqui é um anticorpo com um ou mais porções de carboidrato fixadas ao mesmo que difere de uma ou mais porções de carboidrato fixadas às espécies principais de anticorpo. Exemplos de variantes de glicosilação aqui incluem um anticorpo com uma estrutura de oligossacarídeo G1 ou G2, em vez de uma estrutura de oligossacarídeo G0, fixada a uma região Fc do mesmo, um anticorpo com uma ou duas porções de carboidrato fixadas a uma ou duas cadeias leves do mesmo, um anticorpo sem carboidratos fixados a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, um anticorpo que é sialidado, etc., assim como combinações de tais alterações de glicosilação.

[047] Quando o anticorpo tem uma região Fc, uma estrutura de oligossacarídeo tal como mostrada na Tabela C aqui pode ser fixada a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, por exemplo, no resíduo 299. Para o

Pertuzumab, G0 foi a estrutura de oligossacarídeo predominante, com outras estruturas de oligossacarídeo como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) e G2 encontradas em quantidades menores na composição do Pertuzumab.

TABELA C

Condições de incubação do pico principal	
Condição de incubação da amostra por 12d	% Pico principal CEX
Tempo zero	90-92
Meio fresco	41%
Meio gasto	49%
Glicose	43%
Glicose, peptona, Plurônico	41%
Meio fresco + isolamento de ProA	37%
Meio tampão	56%

[048] A não ser que seja indicado de outra maneira, uma “estrutura de oligossacarídeo G1” aqui inclui as estruturas G1(1-6) e G1(1-3).

[049] Para os fins deste pedido de patente, “variante sialilada” é uma variante das espécies principais de anticorpo que compreende uma ou mais porções de carboidrato sialiladas fixadas a uma ou duas cadeias pesadas do mesmo. Uma variante sialilada pode ser identificada pela avaliação de uma composição (por exemplo, por cromatografia de troca iônica) ou sem tratamento de sialidase, por exemplo, conforme descrito no exemplo.

[050] Uma “variante glicada” é um anticorpo ao qual um açúcar, como glicose, foi ligada de modo covalente. Esta adição pode ocorrer por reação de glicose com um resíduo de lisina na proteína (por exemplo, em meios de cultura de célula). Uma variante glicada pode ser identificada por análise de espectrometria de massa do anticorpo reduzido avaliando o aumento de massa de cadeias pesada ou leve. Uma variante glicada também pode ser quantificada por cromatografia boronato, conforme explicado no Exemplo 1 abaixo. Uma variante glicada difere de uma variante de glicosilação.

[051] Um anticorpo “deamidado” é aquele no qual um ou mais

resíduos de asparagina do mesmo foi derivatizado, por exemplo, para um ácido aspártico, uma succinimida, ou um ácido iso-aspártico. Um exemplo de um anticorpo deamidado é uma variante pertuzumab, em que Asn-386 e/ou Asn-391 em uma ou duas cadeias pesadas de pertuzumab são deamidadas.

[052] Uma “variante de extensão líder amino-terminal” aqui se refere às espécies principais de anticorpo com um ou mais resíduos de aminoácido da sequência líder amino-terminal no amino-terminal de uma ou mais cadeias pesada ou leve das espécies principais de anticorpo. Uma extensão líder amino-terminal compreende ou consiste em três resíduos de aminoácido, VHS, presentes em um ou ambas as cadeias leves de uma variante de anticorpo.

[053] “Homologia” é definida como a porcentagem de resíduos na variante de sequência de aminoácido que é idêntica depois do alinhamento das sequências e introdução de espaços, se necessário, para alcançar a homologia de máxima porcentagem. Métodos e programas de computador para o alinhamento são de conhecimento geral no estado da técnica. Um dos tais programas de computador é "Align 2", de autoria de Genentech, Inc., que foi depositado com documentação de usuário junto à Repartição de Direitos Autorais dos Estados Unidos (United States Copyright Office), Washington, DC 20559, em 10 de dezembro de 1991.

[054] Para os fins deste, “análise de troca catiônica” refere-se a qualquer método através do qual uma composição que compreende dois ou mais compostos é separada com base em diferenças de carga com o uso de um trocador catiônico. Um trocador catiônico geralmente compreende grupos ligados de modo covalente, carregados negativamente. Preferivelmente, o trocador catiônico aqui é um trocador catiônico fraco e/ou compreende um grupo funcional carboxilato, como a coluna de troca catiônica PROPAC WCX-10™ comercializada por Dionex.

[055] Um “receptor HER” é uma proteína tirosina quinase receptora que pertence à família de receptor HER e inclui os receptores EGFR, HER2, HER3 e HER4 e outros membros desta família a serem identificados no futuro. O receptor HER irá compreender, em geral, um domínio extracelular, que pode ligar um ligante HER; um domínio de transmembrana lipofílico; um domínio de tirosina quinase intracelular conservado; e um domínio de sinalização carboxila-terminal abrigando diversos resíduos de tirosina que podem ser fosforilados. Preferivelmente o receptor HER é o receptor HER humano de sequência nativa.

[056] O domínio extracelular de HER2 compreende quatro domínios, Domínio I (resíduos de aminoácido de cerca de 1 a 195), Domínio II (resíduos de aminoácidos de cerca de 196 a 319), Domínio III (resíduos de aminoácido de cerca de 320 a 488), e Domínio IV (resíduos de aminoácido de cerca de 489 a 630) (numeração de resíduo sem peptídeo de sinalização). Ver Garrett *et al. Mol. Cell.* 11: 495 a 505 (2003), Cho *et al. Nature* 421: 756 a 760 (2003), Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004), ou Plowman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746 a 1750 (1993). Ver, também, A Figura. 1 aqui.

[057] Os termos “ErbB1,” “HER1”, “receptor de fator de crescimento epidérmico” e “EGFR” são usados de modo intercambiável aqui e referem-se a EGFR conforme descrito, por exemplo, em Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881 a 914 (1987), incluindo formas mutantes de ocorrência natural do mesmo (por exemplo, um mutante de deleção EGFR como em Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207 a 4211 (1990)). *erbB1* refere-se ao produto de proteína EGFR que codifica o gene.

[058] As expressões “ErbB2” e “HER2” são usadas de modo intercambiável aqui e referem-se à proteína HER2 humana descrita, por exemplo, em Semba *et al., PNAS (USA)* 82:6497 a 6501 (1985) e Yamamoto *et al. Nature* 319:230 a 234 (1986) (Genebank número de acesso X03363). O

termo “*erbB2*” refere-se ao gene que codifica o ErbB2 humano e “*neu*” refere-se ao gene que codifica o p185^{neu} de rato. O HER2 preferível é o HER2 humano de sequência nativa.

[059] “ErbB3” e “HER3” referem-se ao polipeptídeo receptor conforme apresentado, por exemplo, na Patente Nos. U.S. 5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193 a 9197 (1989).

[060] Os termos “ErbB4” e “HER4” aqui referem-se ao polipeptídeo receptor conforme apresentado, por exemplo, na Patente No. EP 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746 a 1750 (1993); e Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473 a 475 (1993), incluindo isoformas do mesmo, por exemplo, conforme apresentado em WO99/19488, publicada em 2 de abril de 1999.

[061] “Ligante HER” quer dizer um polipeptídeo que liga a e/ou ativa um receptor HER. O ligante HER de interesse particular aqui é um HER humano de sequência nativa como o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247:7612 a 7621 (1972)); fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) (Marquardt *et al.*, *Science* 223:1079 a 1082 (1984)); anfiregulina também conhecida como schwanoma ou fator de crescimento autócrino de queratinócito (Shoyab *et al.* *Science* 243:1074 a 1076 (1989); Kimura *et al.* *Nature* 348:257 a 260 (1990); e Cook *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11:2547 a 2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, *Science* 259:1604 a 1607 (1993); e Sasada *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico ligado da heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science* 251:936 a 939 (1991)); epiregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:7495 a 7500 (1995); e Komurasaki *et al.* *Oncogene* 15:2841 a 2848 (1997)); uma heregulina (ver abaixo); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature* 387:512 a 516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562 a 9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari *et al.*

Oncogene 18:2681 a 89 (1999)) ou cripto (CR-1) (Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330 a 3335 (1997)). Ligantes HER que ligam a EGFR incluem EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF e epiregulina. Ligantes HER que ligam a HER3 incluem heregulinas. Ligantes HER capazes de uma ligação a HER4 incluem betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 e heregulinas.

[062] "Heregulina" (HRG) quando usada aqui refere-se a um polipeptídeo codificado pelo produto de gene de heregulina conforme apresentado na Patente No. U.S. 5.641.869 ou Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312 a 318 (1993). Exemplos de heregulinas incluem heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 e heregulina- β 3 (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205 a 1210 (1992); e Patente No. U.S. 5.641.869); fator de diferenciação de *neu* (NDF) (Peles *et al. Cell* 69: 205 a 216 (1992)); atividade de indução de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls *et al. Cell* 72:801 a 815 (1993)); fatores de crescimento glial (GGFs) (Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312 a 318 (1993)); fator derivado de neurônio sensorio e motor (SMDF) (Ho *et al. J. Biol. Chem.* 270:14523 a 14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385 a 1394 (1997)). O termo inclui fragmentos biologicamente ativos e/ou variantes de sequência de aminoácido de um polipeptídeo HRG de sequência nativa, como um fragmento de domínio similar a EGF do mesmo (por exemplo, o HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

[063] Um "dímero HER" aqui é um dímero associado de modo não covalente que compreende pelo menos dois receptores HER diferentes. Tais complexos podem ser formados quando uma célula que expressa dois ou mais receptores HER é exposta a um ligante HER e pode ser isolada por imunoprecipitação e analisada por SDS-PAGE conforme descrito em Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661 a 14665 (1994), por exemplo. Exemplos de tais dímeros HER incluem os heterodímeros EGFR-HER2, HER2-

HER3 e HER3-HER4. Além disso, o dímero HER pode compreender dois ou mais receptores HER2 combinados com um receptor HER diferente, como HER3, HER4 ou EGFR. Outras proteínas, como uma subunidade de receptor de citocina (por exemplo, gp130) podem ser associadas ao dímero.

[064] Um "sítio de ligação heterodimérica" em HER2, refere-se a uma região no domínio extracelular do HER2 que entra em contato com, ou faz interface com, uma região no domínio extracelular de EGFR, HER3 ou HER4 mediante a formação de um dímero através deste. A região se encontra no Domínio II de HER2. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004).

[065] "Ativação de HER" ou "ativação de HER2" refere-se à ativação, ou fosforilação, de qualquer um ou mais receptores HER, ou receptores HER2. Geralmente, resultados de ativação de HER em transdução de sinal (por exemplo, aquela causada por um domínio quinase intracelular de resíduos de tirosina de fosforilação de um receptor HER no receptor HER ou um substrato de polipeptídeo). A ativação de HER pode ser mediada por ligação de ligante HER a um dímero HER que compreende o receptor HER de interesse. Um ligante HER ligado a um dímero HER pode ativar um domínio quinase de um ou mais receptores HER no dímero e, por meio disso, resulta em fosforilação de resíduos de tirosina em uma ou mais dos receptores HER e/ou fosforilação de resíduos de tirosina em substratos de polipeptídeo (s) adicionais, como quinases intracelulares Akt ou MAPK.

[066] O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos bi-específicos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos, contanto que eles demonstrem a atividade biológica desejada.

[067] O termo "anticorpo monoclonal" conforme usado aqui se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos

substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compõem a população são idênticos e/ou ligam o mesmo epítopo, exceto por possíveis variantes que possam surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, com aquelas variantes descritas aqui. Em contraste com preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem anticorpos diferentes direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além de suas especificidades, os anticorpos monoclonais são vantajosos no que diz respeito a não serem contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como uma exigência da produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método hibridoma primeiramente descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (ver, por exemplo, Patente No. U.S. 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos em fago com o uso de técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624 a 628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 a 597 (1991), por exemplo.

[068] Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou cadeia leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse de anticorpos particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles demonstrem a atividade

biológica desejada (Patente No. U.S. 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 a 6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos “primatizados” que compreendem sequências de ligação de antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, Macaco etc.) sequências de região constante humanas.

[069] "Fragmentos de Anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto, que preferivelmente compreende a região variável ou ligada a antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticorpo(s).

[070] Um “anticorpo intacto” é aquele que compreende uma região variável ligada a antígeno 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 (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humanos) ou variantes de sequência de aminoácido do mesmo. Preferivelmente, o anticorpo intacto tem uma ou mais funções efetoras, e compreende uma estrutura de oligossacarídeo fixada a uma ou mais cadeias do mesmo.

[071] A “função efetora” do anticorpo refere-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de variante de sequência de aminoácido) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem ligação de C1q; complementar de citotoxicidade dependente; ligação de receptor Fc; citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; regular negativamente (*down-regulate*) receptores de superfície de célula (por exemplo, receptor de célula B; BCR), etc.

[072] O termo “região Fc” aqui é usado para definir uma região de terminal C de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possa variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humano é normalmente definido para estirar a partir de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou a partir de Pro230, para o carboxila-terminal do mesmo. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a produção ou purificação do anticorpo, ou ao projetar de maneira recombinante o ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Em conformidade, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpo com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpo sem nenhum resíduo K447 removido, e populações de anticorpo que têm uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447.

[073] A não ser que se indique o contrário, a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada de imunoglobulina é aquela do índice EU como em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). O “índice EU como em Kabat” refere-se à numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano.

[074] Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos intactos podem ser designados para diferentes “classes”. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e diversas destas podem ser ainda divididas em “subclasses” (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais

das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[075] “Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” e “ADCC” referem-se a uma reação mediada por célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem um anticorpo ligado em uma célula marcada e subsequentemente causa lise da célula marcada. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457 a 92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio ADCC *in vitro*, como aquele descrito na Patente No. US 5.500.362 ou 5.821.337, pode ser executado. Células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal como aquele apresentado em Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652 a 656 (1998).

[076] “Células efetoras” são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e executam funções efetoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e executam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares de sangue periféricas (PBMC), células natural killer (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com células PBMCs e NK sendo preferíveis. As células efetoras podem estar isoladas de uma fonte nativa das mesmas, por exemplo, de sangue ou PBMCs conforme descrito aqui.

[077] Os termos “receptor Fc” ou “FcR” são usados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR

preferido é uma sequência humana nativa FcR. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e formas ligadas alternativamente destes receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências de aminoácido similares que diferenciam um do outro primariamente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição de imunoreceptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático. (ver revisão M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203 a 234 (1997)). FcRs são analisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457 a 92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25 a 34 (1994); e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330 a 41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, estão na abrangência do termo "FcR" aqui. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência do IgGs materno para o feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

[078] "Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" refere-se à habilidade de uma molécula de causar lise a um alvo na presença de um complemento. A via de ativação de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) complexada com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação de complemento, um ensaio CDC, por exemplo, conforme descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser executado.

[079] "Anticorpos nativos" são, normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, composto de duas cadeias

leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e pesada também tem pontes dissulfeto de intracadeia espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido de um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante em sua outra extremidade. O domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácido particulares formam uma interface entre os domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve.

[080] O termo "variável" refere-se ao fato de que certas porções de domínios variáveis diferem extensivamente em relação à sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. Entretanto, a variabilidade não é uniformemente distribuída pelos domínios variáveis dos anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis tanto nos domínios variáveis de cadeia pesada quanto de cadeia leve. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas de regiões de estrutura (FRs). Cada domínio variável de cadeias leve e pesada nativas compreende quatro FRs, adotando em grande parte uma configuração de β -folha, conectados por três regiões hipervariáveis, que formam laços conectando, e em alguns casos formando parte dele, a estrutura de β -folha. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas ligadas em grande proximidade pelos FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos (ver

Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas demonstram várias funções efectoras, como a participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[081] O termo “região hipervariável” quando usado aqui se refere aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação a antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácido de uma “região determinante de complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, 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*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de “laço hipervariável” (por exemplo, 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 a 917 (1987)). Resíduos de “região de estrutura” ou “FR” são aqueles resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de região hipervariável conforme definido aqui.

[082] A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, chamados fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete sua habilidade de cristalizar prontamente. Tratamento de pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de ligação de antígeno e ainda é capaz de reticular o antígeno.

[083] “Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação de antígeno e de reconhecimento de antígeno completo. Esta

região consiste em um dímero de um domínio de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação em associação estreita, não covalente. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero V_H - V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tenha a habilidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade mais baixa do que todo o sítio de ligação.

[084] O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' se diferenciam dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no carboxi-terminal do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação usada aqui para Fab' no qual o(s) de resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes carregam pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que tem cisteínas de dobradiças entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmento de anticorpo também são conhecidos.

[085] As "cadeias leves" de anticorpos de qualquer espécie vertebrada podem ser designadas para um dos dois tipos claramente distintos, chamados kappa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

[086] Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios de anticorpo V_H e V_L , em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, o polipeptídeo Fv compreende, ainda, um ligante de polipeptídeo entre os

domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv ver Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 a 315 (1994). Fragmentos scFv de anticorpo HER2 são descritos em WO93/16185; Patente No. U.S. 5.571.894; e Patente No. U.S. 5.587.458.

[087] O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio pesado variável (V_H) conectado a um domínio leve variável (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo ($V_H - V_L$). Ao usar um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parearem com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Os diacorpos são descritos mais completamente em, por exemplo, EP 404.097. WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444 a 6448 (1993).

[088] Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, roedor) são anticorpos quiméricos que contém uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em sua maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanizadas (anticorpo recipiente) nas quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídas por resíduos de uma região hipervariável a partir de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que tem a especificidade, afinidade e capacidade desejada. Em algumas instâncias, os resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por se corresponder resíduos não humanos. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente

ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de, pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os laços hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os FRs são aqueles de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado irá compreender ainda, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature* 321:522 a 525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 a 329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 a 596 (1992).

[089] Anticorpos humanizados HER2 incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 ou Trastuzumab (HERCEPTIN®) conforme descrito na Tabela 3 de Patente U.S. 5.821.337 expressamente incorporada aqui a título de referência; 520C9 humanizado (WO93/21319) e anticorpos 2C4 humanizados conforme descritos aqui.

[090] Para os propósitos deste, "Trastuzumab," "HERCEPTIN®," e "huMAb4D5-8" referem-se a um anticorpo que compreende as sequências de aminoácido de cadeia leve e pesada na SEQ ID NOS. 13 e 14, respectivamente.

[091] Aqui, "Pertuzumab" e "rhuMAb 2C4," referem-se a um anticorpo que compreende as sequências de aminoácido de variável leve e de variável pesada nas SEQ ID Nos. 3 e 4, respectivamente. Onde Pertuzumab é um anticorpo intacto, ele preferivelmente compreende as sequências de aminoácido de cadeia leve e cadeia pesada nas SEQ ID Nos. 15 e 16, respectivamente.

[092] Um “anticorpo nu” é um anticorpo (como definido aqui) que não é conjugado a uma molécula heteróloga, como uma porção citotóxica ou rádio-etiquetada.

[093] Um anticorpo “isolado” é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminadores de seu ambiente natural são materiais que interfeririam com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e pode incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado (1) a mais de 95% em peso do anticorpo, conforme determinado pelo método Lowry, e mais preferivelmente mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para que se obtenha pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redutoras ou não redutoras com o uso de coloração azul, ou preferivelmente, prata de Coomassie. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes já que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Ordinariamente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[094] Um anticorpo HER2 que “inibe a dimerização de HER mais com mais eficácia do que o Trastuzumab” é aquele que reduz ou elimina dímeros HER com mais eficácia (por exemplo, pelo menos cerca de 2 vezes mais eficácia) do que Trastuzumab. Preferivelmente, tal anticorpo inibe a dimerização de HER2 pelo menos tão eficazmente quanto um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste do anticorpo monoclonal muríneo intacto 2C4, um fragmento Fab de anticorpo monoclonal muríneo 2C4, Pertuzumab intacto, e um fragmento Fab de Pertuzumab. Um indivíduo pode avaliar a inibição de dimerização de HER ao estudar dímeros HER diretamente,

ou por avaliar a ativação de HER, ou sinalização a jusante, o que resulta da dimerização de HER, e/ou por avaliar o sítio de ligação do anticorpo HER2, etc. Ensaios para a triagem para anticorpos com a habilidade de inibir a dimerização de HER mais eficazmente do que Trastuzumab são descritos em Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002) e WO 01/00245 (Adams *et al.*). Como exemplo, apenas, um indivíduo pode testar para a inibição de dimerização de HER por avaliar, por exemplo, a inibição da formação de dímero HER (ver, por exemplo, a Figura 1A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002); e WO 01/00245); a redução em ativação de ligante HER de células que expressam dímeros HER (WO01/00245 e Figura 2A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002), por exemplo); bloquear a ligação de ligante HER a células que expressam dímeros HER (WO01/00245, e Figura 2E de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002), por exemplo); inibição de crescimento celular de células cancerosas (por exemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expressam dímeros HER na presença (ou ausência) do ligante HER (WO01/00245 e as Figuras 3A-D de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002), por exemplo); inibição de sinalização a jusante (por exemplo, inibição de fosforilação AKT dependente de HRG ou inibição de fosforilação MAPK dependente de HRG- ou TGF α -) (ver, WO01/00245, e Figura 2C-D de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002), por exemplo). Um indivíduo poderá também testar se o anticorpo inibe a dimerização de HER por estudar o sítio de ligação do anticorpo HER2, por exemplo, por avaliar uma estrutura ou modelo, como uma estrutura de cristal, do anticorpo ligado ao HER2 (Ver, por exemplo, Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004)).

[095] O anticorpo HER2 pode “inibir fosforilação AKT dependente de HRG” e/ou inibir “fosforilação MAPK dependente de HRG ou TGF α ” mais eficazmente (por exemplo, pelo menos 2 vezes mais eficazmente) do que

Trastuzumab (ver Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127 a 137 (2002) e WO01/00245, como exemplo).

[096] O anticorpo HER2 pode ser aquele que não “não inibe a clivagem do ectodomínio HER2” (Molina *et al. Cancer Res.* 61:4744 a 4749(2001)).

[097] Um anticorpo HER2 que “se liga a um sítio de ligação heterodimérica” de HER2, se liga a resíduos no domínio II (e opcionalmente também se liga a resíduos em outros domínios do domínio extracelular HER2, como os domínios I e III), e pode impedir estericamente, ao menos até certo ponto, a formação de um heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3, ou HER2-HER4. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004) caracteriza a estrutura de cristal HER2-Pertuzumab, depositada com o Banco de Dados de Proteína RCSB (ID Código IS78), ilustrando um anticorpo exemplificador que se liga ao sítio de ligação heterodimérica de HER2.

[098] Um anticorpo que “se liga ao domínio II” de HER2 se liga a resíduos no domínio II e opcionalmente a resíduos em outro(s) domínio(s) de HER2, tal como os domínios I e III.

[099] Um “agente inibitório de crescimento” quando usado aqui refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente uma célula HER de expressão de câncer ou *in vitro* ou *in vivo*. Portanto, o agente inibitório de crescimento pode ser aquele que significativamente reduz a porcentagem de células HER de expressão em fase S. exemplos de agentes inibitórios de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo de célula (em um local diferente de fase S), como agentes que induzem interrupção G1 e interrupção fase M. Bloqueadores de fase M clássicos incluem as vincas (vincristina e vimblastina), taxanos, e inibidores topo II como doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, e bleomicina. Aqueles agentes que interrompem G1 também servem para

interrupção de fase S, por exemplo, agentes de alquilação de DNA como tamoxifena, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracila, e ara-C. informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogene, e antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente a p. 13.

[0100] Exemplos de anticorpos "inibitórios de crescimento" são aqueles que se ligam ao HER2 e inibem o crescimento de células cancerosas que superexpressam o HER2. Anticorpos HER2 inibitórios de crescimento preferíveis inibem o crescimento de células de tumor de mama SK-BR-3 em cultura de célula em mais de 20%, e preferivelmente mais de 50% (por exemplo, de cerca de 50% a cerca de 100%) em uma concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml, onde a inibição de crescimento é determinada seis dias após a exposição das células SK-BR-3 ao anticorpo (ver Patente No. U.S. 5.677.171 publicada em 14 de outubro de 1997). O ensaio de inibição de crescimento de células SK-BR-3 é descrito em maiores detalhes naquela patente e abaixo. o anticorpo inibitório de crescimento preferido é uma variante humanizada do anticorpo monoclonal murídeo 4D5, por exemplo, Trastuzumab.

[0101] Um anticorpo que "induz apoptose" é aquele que induz uma morte celular programada conforme determinado através da ligação de anexina V, fragmentação de DNA, redução celular, dilatação de retículo endoplasmático, fragmentação celular, e/ou formação de vesículas de membrana (chamadas de corpos apoptóticos). A célula é usualmente aquela que superexpressa o receptor HER2. Preferencialmente, a célula é uma célula tumoral, por exemplo, uma célula da mama, do ovário, do estômago, do endométrio, da glândula salivar, do pulmão, do rim, do colo, da tiróide, do pâncreas ou da bexiga. *In vitro*, a célula pode ser uma célula SK-BR-3, BT474,

célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou célula SKOV3. Vários métodos estão disponíveis para avaliar os eventos celulares associados a apoptose. Por exemplo, a translocação de fosfatidilserina (PS) pode ser medida através da ligação de anexina; a fragmentação de DNA pode ser avaliada através de escalonamento de DNA (*"laddering"*); e condensação de cromatina/nuclear junto com a fragmentação de DNA pode ser avaliada por qualquer aumento em células hipodiplóides. Preferencialmente, o anticorpo que induz apoptose é aquele que resulta em cerca de 2 a 50 dobras, preferencialmente cerca de 5 a 50 dobras, e com mais preferência de cerca de 10 a 50 dobras, sendo que a indução de ligação de anexina relativa à célula não tratada em um ensaio de ligação de anexina usa células BT474 (ver abaixo). Os exemplos de anticorpos HER2 que induzem apoptose são 7C2 e 7F3.

[0102] A " epítopo 2C4" é a região no domínio extracelular do HER2 na qual o anticorpo 2C4 se liga. Com a finalidade de triar os anticorpos que se ligam à epítopo 2C4, um ensaio de rotina de bloqueio cruzado tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser executado. Alternativamente, um mapeamento epítopo pode ser executado para avaliar se o anticorpo se liga à epítopo 2C4 de HER2 usando métodos conhecidos no estado da técnica e/ou um indivíduo pode estudar a estrutura do anticorpo-HER2 (Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004)) para verificar que domínio(s) do HER2 é/são ligado(s) pelo anticorpo. A epítopo 2C4 compreende resíduos a partir do domínio II no domínio extracelular do HER2. 2C4 e Pertuzumab se ligam ao domínio extracelular do HER2 na junção dos domínios I, II e III. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317 a 328 (2004).

[0103] A "epítopo 4D5" é a região no domínio extracelular do HER2 na qual o anticorpo 4D5 (ATCC CRL 10463) e Trastuzumab se ligam. Essa epítopo situa-se próxima ao domínio transmembrana do HER2, e dentro

do Domínio IV do HER2. Para a triagem de anticorpos que se ligam à epítopo 4D5, um ensaio de rotina de bloqueio cruzado tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser executado. Alternativamente, um mapeamento epítopo pode ser executado para avaliar se o anticorpo se liga à epítopo 4D5 do HER2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região de cerca do resíduo 529 a cerca do resíduo 625, incluídos, na Figura 1).

[0104] A "epítopo 7C2/7F3" é a região no N-terminal, dentro do Domínio I, do domínio extracelular do HER2 no qual os anticorpos 7C2 e/ou 7F3 (cada depositado com o ATCC, ver abaixo) se ligam. Para a triagem de anticorpos que se ligam à epítopo 7C2/7F3, um ensaio rotineiro de bloqueio cruzado tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser executado. Alternativamente, um mapeamento epítopo pode ser executado para estabelecer se o anticorpo se liga à epítopo 7C2/7F3 no HER2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região a partir de cerca do resíduo 22 a cerca do resíduo 53 do HER2 na Figura 1).

[0105] "Tratamento" se refere tanto ao tratamento terapêutico e profilático quanto às medidas preventivas. Aqueles com necessidade de tratamento incluem aqueles que já têm a doença assim como aqueles na qual a doença deve ser prevenida. Portanto, o paciente a ser tratado aqui pode ser diagnosticado como tendo a doença ou como predisposto ou suscetível à doença.

[0106] Os termos "câncer" e "canceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada através do crescimento celular desregulado. Os exemplos de câncer incluem, mas não se limitam a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluindo meduloblastoma e retinoblastoma), sarcoma (incluindo liposarcoma e sarcoma

celular sinovial), tumores neuroendócrinos (incluindo tumores carcinóides, gastrinoma, e câncer em célula de ilhotas), mesotelioma, schwanoma (incluindo neurinoma do acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem câncer nas células escamosas (por exemplo, câncer de célula escamosa epitelial), câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de células não-pequenas, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão, câncer de peritônio, câncer hepatocelular, gástrico ou câncer de estômago incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de colo, câncer de reto, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer renal ou de rim, câncer de próstata, câncer de vulva, câncer de tireóide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pênis, câncer de testículo, câncer de esôfago, tumores do trato biliar, assim como câncer de cabeça e pescoço.

[0107] O termo “quantidade eficaz” se refere a uma quantidade de uma droga eficaz para tratar a doença no paciente. Onde a doença é câncer, a quantidade eficaz da droga pode reduzir o número de células de câncer; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, diminuir de certa forma e preferencialmente parar) a infiltração de célula de câncer nos órgãos periféricos; inibir (isto é, diminuir de certa forma e preferencialmente parar) a metástase do tumor; inibir, de certa forma, o crescimento de tumor; e/ou aliviar de certa forma um ou mais dos sintomas associados com o câncer. De certa forma, a droga pode prevenir o crescimento e/ou exterminar a existência de células de câncer, e pode ser citostática e/ou citotóxica. A quantidade eficaz pode estender a sobrevivência livre de progressão, resultando em uma resposta objetiva (incluindo uma resposta parcial, PR, ou resposta completa,

CR), aumentar o tempo de sobrevida global, e/ou aperfeiçoar um ou mais sintomas de câncer.

[0108] Um “câncer positivo para HER2” é aquele que compreende células que têm proteína HER2 presente em sua superfície celular.

[0109] Um câncer que “superexpressa” um receptor HER é aquele que tem níveis significativamente mais altos de um receptor HER, como HER2, na superfície celular do mesmo, comparado a uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Tal superexpressão pode ser causada através da amplificação de gene ou através de uma transcrição ou translação aumentada. A superexpressão do receptor HER pode ser determinada em um ensaio diagnóstico ou prognóstico através da avaliação de níveis elevados da proteína HER presente sobre a superfície de uma célula (por exemplo, através de um ensaio imuno-histoquímico; IHC). Alternativa ou adicionalmente, um indivíduo pode medir níveis de ácidos nucleicos que codificam HER na célula, por exemplo, através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH; ver WO98/45479 publicada em Outubro de 1998), “*southern blot*” ou técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), como PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Um indivíduo também pode estudar a superexpressão de receptor HER através da medição de antígeno derramado (por exemplo, domínio extracelular HER) em um fluido biológico como soro (ver, por exemplo, patente de No. U.S. 4.933.294 depositado em 12 de Junho de 1990; WO91/05264 publicada em 18 de Abril de 1991; patente de No. U.S. 5.401.638 depositada em 28 de Março de 1995; e Sias *et al. J. Immunol. Methods* 132: 73 a 80 (1990)). Com exceção dos ensaios acima, vários ensaios *in vivo* encontram-se disponíveis para o profissional versado. Por exemplo, um indivíduo pode expor células dentro do corpo de um paciente para um anticorpo que é marcado opcionalmente com um marcador detectável, por exemplo, um isótopo radioativo, e a ligação do anticorpo às células no paciente pode ser avaliada, por exemplo, através de

varredura externa para radioatividade ou através da análise de uma biópsia retirada de um paciente previamente exposto ao anticorpo.

[0110] Contrariamente, um câncer que “não superexpressa um receptor HER2” é aquele que não expressa mais do que níveis normais de receptor HER2 comparado a uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido.

[0111] Um câncer que “superexpressa” um ligante HER é aquele que produz níveis significativamente mais altos daquele ligante comparado a uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Tal superexpressão pode ser causada através de amplificação de gene ou através de transcrição ou translação aumentada. A superexpressão do ligante HER pode ser diagnosticamente determinada pela avaliação de níveis do ligante (ou ácidos nucleicos que o codificam) no paciente, por exemplo, em uma biópsia de tumor ou através de vários ensaios diagnósticos como o IHC, FISH, “*southern blot*”, PCR ou ensaios *in vivo* descritos acima.

[0112] O termo “agente citotóxico” conforme usado aqui se refere a uma substância que inibe ou evita a função de células e/ou causa a destruição de células. O termo pretende incluir isótopos radioativos (por exemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, e toxinas como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fungosa, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes dos mesmos.

[0113] Um “agente quimioterápico” é um composto químico útil no tratamento de câncer. Os exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes de alquilação como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquila como busulfano, improsulfano e piposulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina,

trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopoletina, e 9-amino-camptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo sua adozelesina, carzelesina e análogos sintéticos de bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposide; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureia como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina; antibióticos como os antibióticos enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I e caliqueamicina omega1I (ver, por exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183 a 186 (1994)); dimicina , incluindo dimicina A; uma esperamicina; assim como cromóforo de neocarcinostatina e cromóforos de antibiótico de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, atinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluindo ADRIAMYCIN®, morfolinadoxorrubicina, cianomorfolinadoxorrubicina, 2-pirrolinadoxorrubicina, injeção de doxorrubicina lipossomal de HCl (DOXIL®), doxorrubicina lipossomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorrubicina lipossomal peguilada (CAELYX®), e deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como

mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos como metotrexato, gencitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), uma epotilona, e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico como ácido fronílico; aceglatona; aldofosfamida; glicosida; ácido aminolevulínico; eniluracila; ansacrina; bestrabucila; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinan; lonidainina; maitansinóides como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complexo de polissacarídeo PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxóide, por exemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulação de nanopartícula projetada por albumina de paclitaxel (ABRAXANE®), e docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platina como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vincas, que evitam a polimerização de tubulina a partir da formação de microtúbulos, incluindo vimblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), e vinorelbina (NAVELBINE®); etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina;

novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides como ácido retinóico, incluindo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido/zoledronato de zoledrônico (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) ou risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (um análogo de 1,3-dioxolano nucleosídeo citosina); oligonucleotídeos *antisense*, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes em vias de sinalização comprometidos com a proliferação celular aberrante, como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas como vacina THERATOPE® e vacinas de terapia de gene, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; inibidor 1 de topoisomerase (por exemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por exemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inibidor de COX-2 (por exemplo, celecoxib ou etoricoxib), inibidor de proteasome (por exemplo, PS341); bortezomibe (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inibidor de Bcl-2 como sódio de oblimersen (GENASENSE®); pixantrona; inibidores de EGFR (ver definição abaixo); inibidores de tirosina quinase (ver definição abaixo); e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer dos citados acima; assim como as combinações de dois ou mais dos citados acima como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de clofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para um tratamento administrado com oxaliplatina (ELOXATIN®) combinado com 5-FU e leucovorina.

[0114] Também incluídos nessa definição estão os agentes anti-hormonais que atuam para a regularização ou inibição de ação hormonal nos tumores como anti-estrogênios com perfil antagonista/agonista misturado,

incluindo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidróxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, e moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) como SERM3; anti-estrogênios puros sem propriedades agonistas, como fulvestrante (FASLODEX⁷), e EM800 (tais agentes podem bloquear a dimerização do receptor de estrogênio (ER), inibir a ligação de DNA, aumento da renovação (turnover) de ER, e/ou supressão dos níveis de ER); inibidores de aromatase, incluindo inibidores de aromatase esteroidal como formestano e exemestano (AROMASIN®), e inibidores de aromatase não esteroidal como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) e aminoglutetimida, e outros inibidores de aromatase incluindo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas do hormônio de liberação de hormônio luteinizante, incluindo leuprolida (LUPRON® e ELIGARD®), goserelina, buserelina e tripterelina; esteróides sexuais, incluindo progestinas como acetato de megestrol e acetato de medróxiprogesterona, estrogênios como dietilestilbestrol e premarina, e andrógenos/retinóides como fluoximesterona, todos os ácidos transretiônicos e fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos do receptor de estrogênio (ERDs); anti-androgênios como flutamida, nilutamida e bicalutamida; testolactona; e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos e derivados de quaisquer dos citados acima; assim como as combinações de dois ou mais dos citados acima.

[0115] Conforme usado na presente invenção, o termo “droga direcionada ao EGFR” se refere a um agente terapêutico que se liga ao EGFR e, opcionalmente, inibe a ativação do EGFR. Os exemplos de tais agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que se ligam ao EGFR. Os exemplos de anticorpos que se ligam ao EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (ver, patente No. U.S.4.943.533, Mendelsohn *et al.*) e variantes dos

mesmos, como 225 quimerizado (C225 ou Cetuximab; ERBUTIX®) e 225 humano reconformado (H225) (ver, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, um anticorpo direcionado ao EGFR totalmente humano (Imclone); anticorpos que se ligam ao EGFR mutante do tipo II (patente No. U.S.5.212.290); anticorpos quiméricos e humanizados que se ligam ao EGFR conforme descrito na patente No. US 5.891.996; e anticorpos humanos que se ligam ao EGFR, como ABX-EGF ou Panitumumab (ver WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* *Eur. J. Cancer* 32A:636 a 640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) um anticorpo EGFR humanizado direcionado contra o EGFR que compete tanto com EGF quanto com TGF-alfa para ligação de 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 a 30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente citotóxico, assim, gerando um imunoconjugado (ver, por exemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Os antagonistas de EGFR incluem moléculas pequenas, como por exemplo, os compostos descritos nas patentes de Nos: U.S.5.616.582, U.S.5.457.105, U.S.5.475.001, U.S.5.654.307, U.S.5.679.683, U.S.6.084.095, U.S.6.265.410, U.S.6.455.534, U.S.6.521.620, U.S.6.596.726, U.S.6.713.484, U.S.5.770.599, U.S.6.140.332, U.S.5.866.572, U.S.6.399.602, U.S.6.344.459, U.S.6.602.863, U.S.6.391,874, U.S.6.344,455, U.S.5.760.041, U.S.6.002.008, e U.S.5.747.498, assim como as seguintes publicações de PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016, e WO99/24037. Os antagonistas de EGFR de molécula pequena particular incluem OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propóxi]-6-quinazolinil]-, dihidrocloreto,

Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3--Cloro-4--fluoroanilina)-7-metóxi-6-(3-morfolinopropóxi)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-ila)-pirimida[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-6-ila]-fenol); (R)-6-(4-hidróxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etóxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Sugen); AG1571 (SU 5271; Sugén); inibidores duplos de tirosina quinase EGFR/HER2 como lapatinib (GW 572016 ou N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metóxi]fenil]6[[[2metilsulfonil]etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; GlaxoSmithKline) ou cianoguanidina quinazolina e derivados de cianoamidina quinazolamina.

[0116] Um “inibidor de tirosina quinase” é uma molécula que inibe a atividade de tirosina quinase de uma tirosina quinase como um receptor HER. Os exemplos de tais inibidores incluem as drogas direcionadas ao EGFR anotadas no parágrafo precedente; inibidor de tirosina quinase HER2 de molécula pequena como TAK165 disponível junto à Takeda; CP-724,714, um inibidor seletivo oral do receptor de tirosina quinase ErbB2 (Pfizer e OSI); inibidores duplos HER como EKB-569 (disponíveis junto à Wyeth) que preferencialmente se ligam ao EGFR, mas inibem tanto as células de superexpressão HER2 quanto EGFR; lapatinib (GW572016; disponível junto à GlaxoSmithKline) e inibidor de tirosina quinase oral HER2 e EGFR; PKI-166 (disponível junto à Novartis); inibidores pan-HER como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inibidores Raf-1 como o agente *antisense* ISIS-5132 disponível junto à ISIS Pharmaceuticals que inibe a sinalização do Raf-1; inibidores TK direcionados ao não HER como mesilato de Imatinib (GLEEVAC®) disponível junto à Glaxo; inibidor CI-1040 de quinase I regulada extracelular MAPK

(disponível junto à Pharmacia); quinazolinas, como PD 153035, 4-(3-cloroanilina) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamina)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilina)ftalimida); trifostinas contendo porções de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas *antisense* (por exemplo, aquelas que se ligam ao ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente No. U.S.5.804.396); trifostinas (patente No. U.S.5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inibidores pan-HER 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 cianoamidina quinazolamina; ou conforme descrito em quaisquer dentre as seguintes publicações de patente: patentes No. U.S.5.804.396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); WO96/33980 (Zeneca); e US2005/0101617.

[0117] Um “agente antiangiogênico” se refere a um composto que bloqueia, ou interfere em certo grau, o desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator antiangiogênico pode, por exemplo, ser uma molécula pequena ou um anticorpo que se liga a um fator de crescimento ou a um receptor de fator de crescimento envolvido em promoção de angiogênese. O fator antiangiogênico preferencial nesta presente invenção é um anticorpo que se liga ao Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), como Bevacizumab (AVASTIN®).

[0118] O termo "citocina" é um termo genérico para proteínas

liberadas por uma população celular que atua em outra célula como mediadores intercelulares. Os exemplos de tais citocinas são linfoquinas, monoquinas, e hormônios polipeptídeos tradicionais. Incluídos entre as citocinas estão o hormônio de crescimento como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionila, e hormônio de crescimento bovino; hormônio paratiróide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormônios de glicoproteína como hormônio de estimulação folicular (FSH), hormônio estimulação da tireóide (TSH), e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento do fibroblasto; prolactina; lactogênio placentar; fator- α e - β de necrose tumoral; substância inibidora de muleriano; peptídeo associado à gonadotropina em camundongo; inibidor; ativador; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervo como NGF- β ; fator de crescimento de plaqueta; fatores de crescimento de transformação (TGFs) como TGF- α e TGF- β ; fator-I e -II de crescimento semelhante à insulina; eritropoietina (EPO); fatores ósteo-indutivos; interferonas como interferona- α , - β , e - γ ; fatores de estimulação de colônia (CSFs) como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs) como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; um fator de necrose tumoral como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores polipeptídeos incluindo os ligantes LIF e kit (KL). Conforme usado na presente invenção, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de célula recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

II. COMPOSIÇÕES VARIANTES DO ANTICORPO HER2

[0119] A presente invenção preocupa-se, pelo menos em parte, com certas composições do anticorpo HER2. Preferencialmente, o anticorpo HER2 (um ou ambos, as espécies principais de anticorpo HER2 e a variante do

anticorpo do mesmo) é aquele que se liga ao Domínio II do HER2, inibe a dimerização do HER mais efetivamente do que Trastuzumab, e/ou se liga a um sítio de ligação heterodímera do HER2. A modalidade preferencial nesta presente invenção das espécies principais de anticorpo é aquele que compreende as sequências de aminoácido de variável leve e de variável pesada nas SEQ ID Nos. 3 e 4, e com mais preferência compreende as sequências de aminoácido de cadeia leve e de cadeia pesada nas SEQ ID Nos. 15 e 16 (Pertuzumab).

[0120] A composição da presente invenção compreende espécies principais de anticorpo HER2 que se ligam ao domínio II do HER2, e variantes ácidas do mesmo em que as variantes ácidas incluem uma, duas ou três de variantes glicadas, variante dissulfeto reduzida, e variante não reduzível. As variantes ácidas na composição podem incluir uma, duas, três, quatro ou cinco de variantes glicadas, variante deamidada, variante dissulfeto reduzida, variante sialilada, e variante não reduzível. Preferencialmente, a quantidade total de todas as variantes ácidas na composição é menor do que cerca de 25%. Em uma modalidade, a variante glicada, variante deamidada, variante dissulfeto reduzida, variante sialilada, e variante não reduzível constituem ao menos cerca de 75 a 80% das variantes ácidas na composição.

[0121] A presente invenção adicionalmente se preocupa com uma composição que compreende espécies principais de anticorpo HER2 que compreende sequências de variável leve e variável pesada nas SEQ ID Nos. 3 e 4, respectivamente, e variantes ácidas das mesmas espécies principais de anticorpo, em que as variantes ácidas incluem uma, duas, três, quatro ou cinco de variante glicada, variante deamidada, variante reduzida dissulfeto, variante sialilada e variante não reduzível.

[0122] A presente invenção fornece um método de produção de uma composição farmacêutica que compreende: (1) preparar uma composição

que compreende espécies principais de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II do HER2, e variantes ácidas do mesmo incluindo variante glicada, variante reduzida dissulfeto ou variante não reduzível, e (2) avaliar as variantes ácidas na composição, e confirmar que a quantidade da mesma é menor do que cerca de 25%. O método contempla a combinação da composição antes, durante ou após a etapa (2) com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição avaliada na etapa (2) é um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0123] Em uma modalidade, ao menos cerca de 75 a 80% de variantes ácidas (que constituem menos do que cerca de 25% da composição) são selecionadas a partir de: variante glicada, variante deamidada, variante dissulfeto reduzida, variante sialilada e variante não reduzível.

[0124] As variantes ácidas podem ser avaliadas através de uma variedade de métodos, mas, preferencialmente, tais métodos incluem uma, duas, três, quatro ou cinco de: cromatografia de troca iônica (IEC) em que a composição é tratada com sialidase antes, após, e/ou durante a IEC (por exemplo, para avaliar a variante sialilada), CE-SDS reduzido (por exemplo, para avaliar a variante dissulfeto reduzida), CE-SDS não reduzido (por exemplo, para avaliar a variante não reduzível), cromatografia de boronato (por exemplo, para avaliar a variante glicada), e mapeamento de peptídeo (por exemplo, para avaliar a variante deamidada).

[0125] Em uma modalidade, as variantes ácidas em geral, são avaliadas através de cromatografia de troca iônica, por exemplo, com o uso de um trocador de cátion fraco e/ou trocador de cátion com um grupo funcional de carboxilato (por exemplo, com o uso de uma cromatografia em coluna de DIONEX PROPAC™ WCX-10). Em uma modalidade de tal cromatografia, as condições para a cromatografia envolvem Buffer A de 20mM BisTris, pH 6,0; Buffer B de 20mM BisTris, NaCl de 200mM, pH 6,0; e um gradiente de 0,5% de

Buffer B a 1,0mL/min.

[0126] A composição opcionalmente inclui uma variante de extensão líder de amino-terminal. Preferencialmente, a extensão líder de amino-terminal está em uma cadeia leve da variante de anticorpo (por exemplo, em uma ou duas cadeias leves da variante de anticorpo). As espécies principais de anticorpo HER2 ou a variante de anticorpo pode ser um anticorpo intacto ou um fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab de fragmentos de $F(ab=)_2$), mas, de preferência, ambos são anticorpos intactos. A variante de anticorpo aqui pode compreender uma extensão líder amino-terminal em qualquer uma ou mais das cadeias leve e pesada da mesma. Preferencialmente, a extensão líder amino-terminal está em uma ou duas cadeias leves do anticorpo. A extensão líder amino-terminal preferencialmente compreende ou consiste em VHS-. A presença da extensão líder amino-terminal na composição pode ser detectada através de várias técnicas analíticas que incluem, mas não se limitam a, análise de sequência N-terminal, ensaio para heterogeneidade de carga (por exemplo, cromatografia de troca de cátion ou eletroforese capilar de zona), espectrometria de massa, etc. A quantidade da variante de anticorpo na composição geralmente se estende a partir de uma quantidade que constitui o limite de detecção inferior de qualquer ensaio (preferencialmente análise de troca de cátion) usado para detectar a variante para uma quantidade menor do que a quantidade das espécies principais de anticorpo. Geralmente, cerca de 20% ou menos (por exemplo, a partir de cerca de 1% a cerca de 15%, por exemplo, a partir de cerca de 5% a cerca de 15%, e preferencialmente a partir de cerca de 8% a cerca de 12 %) das moléculas de anticorpo na composição compreendem uma extensão líder amino-terminal. Tais quantidades percentuais são preferencialmente determinadas com o uso de análise de troca de cátion.

[0127] Adicionalmente, alterações de sequência de aminoácido das espécies principais de anticorpo e/ou variante são contempladas, incluindo, mas não se limitando a, um anticorpo que compreende um resíduo de lisina C-terminal em uma ou ambas as cadeias pesadas do mesmo (tal variante de anticorpo pode estar presente em uma quantidade a partir de cerca de 1% a cerca de 20%), um anticorpo com um ou mais resíduos de metionina oxidada (por exemplo, Pertuzumab que compreende met-254 oxidada) etc.

[0128] Além disso, com exceção da variante sialilada discutida acima, as espécies principais de anticorpo ou suas variantes podem compreender variações de glicosilação adicional, exemplos não limitantes os quais incluem um anticorpo que compreende uma estrutura de oligossacarídeo G1 ou G2 fixada à região Fc da mesma, um anticorpo que compreende uma porção de carboidrato fixada a uma cadeia leve da mesma (por exemplo, uma ou duas porções de carboidrato, como glucose ou galactose, fixadas a uma ou duas cadeias leves do anticorpo, por exemplo, fixadas a um ou mais resíduos de lisina), um anticorpo que compreende uma ou duas cadeias pesadas não glicosiladas, etc.

[0129] Opcionalmente, o anticorpo compreende uma ou duas cadeias leves, em que uma ou ambas das cadeias leves compreendem a sequência de aminoácido na SEQ ID No. 23 (incluindo variantes da mesma, como aquelas descritas aqui). O anticorpo compreende adicionalmente uma ou duas cadeias leves, em que uma ou ambas as cadeias pesadas compreendem a sequência de aminoácido na SEQ ID NO. 16 ou SEQ ID NO. 24 (incluindo variantes da mesma como aquela descrita aqui).

[0130] A composição pode ser recuperada a partir de uma linhagem celular geneticamente projetada, por exemplo, uma linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) que expressa o anticorpo HER2 ou pode ser preparada através de síntese de peptídeo.

III. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS HER2

[0131] Uma descrição segue conforme técnicas exemplificadoras para a produção dos anticorpos usados de acordo com a presente invenção. O antígeno HER2 para ser usado na produção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do domínio extracelular do HER2 ou uma porção da mesma, contendo a epítipo desejada. Alternativamente, as células que expressam HER2 em sua superfície celular (por exemplo, células NIH-3T3 transformadas para superexpressar HER2; ou uma linhagem celular de carcinoma como células SK-BR-3, ver Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691 a 8695 (1991)) pode ser usada para gerar anticorpos. Outras formas de HER2 úteis para gerar anticorpos estarão aparentes para aqueles versados na técnica.

(I) ANTICORPOS MONOCLONAIS

[0132] Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou se ligam à mesma epítipo, exceto para variantes possíveis que podem aparecer durante a produção do anticorpo monoclonal, como aquelas variantes descritas aqui. Assim, o "monoclonal" modificador indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos distintos.

[0133] Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser feitos com o uso do método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler *et al., Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante (patente No. U.S.4.816.567).

[0134] No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, como um hamster, é imunizado conforme descrito acima para obter linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína usada para imunização.

Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos, então, são fundidos com células de mieloma com o uso de um agente de fusão adequado, como glicol de polietileno, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59 a 103 (Academic Press, 1986)).

[0135] As células de hibridoma dessa forma preparadas, são semeadas e crescem em um meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais e não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais carecem da enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), cujas substâncias evitam o crescimento de células deficientes de HGPRT.

[0136] As células de mieloma preferenciais são aquelas que se fundem de forma eficiente, suportam a produção de alto nível estável de anticorpo através das células de produção de anticorpo selecionado e são sensíveis a um meio como meio HAT. Dentre essas, as linhagens celulares de mieloma preferenciais são linhagens de mieloma murídeo, como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis junto à Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis junto à American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. As linhagens celulares de heteromieloma humano-camundongo e mieloma humano também descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 a 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0137] O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem

é examinado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferencialmente, a especificação da ligação de anticorpos monoclonais produzidos através de células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA).

[0138] A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através da análise Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0139] Após as células de hibridoma serem identificadas como aquelas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejadas, os clones podem ser sub-clonados através de procedimentos de diluição limitada e crescem através de métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59 a 103 (Academic Press, 1986)). O meio de cultura adequado para esse propósito inclui, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Adicionalmente, as células de hibridoma podem crescer *in vivo* como tumores ascíticos em um animal.

[0140] Os anticorpos monoclonais secretados através dos sub- clones são separados de maneira adequada a partir do meio de cultura, fluido ascítico, ou soro através de procedimentos convencionais de purificação de anticorpo como, por exemplo, proteína Sefarose A, cromatografia de hidroxapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

[0141] O DNA que codifica os anticorpos monoclonais é isolado prontamente e sequenciado com o uso de procedimentos convencionais (por exemplo, através do uso de sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligarem especificamente aos genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos de murídeo). As células de hibridoma servem como uma fonte preferencial de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são, então, transfectados para células hospedeiras

como células *E. coli*, células de símio COS, células do 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 revisão em expressão recombinante em bactéria de DNA que codifica o anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256 a 262 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151 a 188 (1992).

[0142] Em uma modalidade adicional, os anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpo geradas com o uso de técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552 a 554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624 a 628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 a 597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murídeos e humanos, respectivamente, com o uso de bibliotecas de fago. As publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa nM) através de embaralhamento de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779 a 783 (1992)), assim como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para a construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265 a 2266 (1993)). Dessa forma, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas tradicionais de hibridoma anticorpo monoclonal para o isolamento de anticorpos monoclonais.

[0143] O DNA também pode ser modificado, por exemplo, através da substituição da sequência de codificação para domínios constantes de cadeia leve e de cadeia pesada no lugar das sequências murídeas homólogas (patente No. U.S.4.816.567; e Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), ou através da união de maneira covalente a toda ou parte da sequência de codificação de imunoglobina da sequência de codificação para

um polipeptídeo de não imunoglobina.

[0144] Tipicamente tais polipeptídeos de não imunoglobina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo, ou eles são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo quimérico bivalente que compreende um sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno diferente.

(II) ANTICORPOS HUMANIZADOS

[0145] Os métodos para a humanização de anticorpos não humanos foram descritos no estado da técnica. Preferencialmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos no mesmo a partir de uma fonte que é não humana. Esses resíduos de aminoácido não humano são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente executada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522 a 525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323 a 327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534 a 1536 (1988)), através da substituição de sequências de região hipervariável pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Em conformidade, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (patente No. U.S.4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente a partir de espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de região hipervariável e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos a partir de sítios análogos em anticorpos de roedor.

[0146] A escolha de domínios variáveis humanos, ambos leve e

pesado, para serem usados na produção de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humano conhecida. A sequência humana que é mais próxima da de um roedor é, então, 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 usa uma região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias pesadas e leves. A mesma estrutura pode ser usada para inúmeros anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0147] É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar esse objetivo, de acordo com um método preferencial, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências parentais e de vários produtos humanizados conceituais que usam modelos tridimensionais das sequências humanizadas e parentais. Os modelos de imunoglobina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares àqueles versados na técnica. Os programas de computador estão disponíveis os quais ilustram e mostram estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobina candidatas selecionadas. A inspeção dessas telas permite a análise da função provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a habilidade da imunoglobina candidata que se liga ao seu antígeno. Dessa forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir do

recipiente e importar sequências de modo que a característica desejada do anticorpo, como afinidade aumentada para o(s) antígeno alvo, seja alcançada. Em geral, os resíduos de região hipervariável são direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígeno.

[0148] A patente No. U.S.6.949.245 descreve a produção de anticorpos HER2 humanizados exemplificadores que se ligam ao HER2 e bloqueiam a ativação de ligante de um receptor HER. O anticorpo humanizado de interesse particular na presente invenção, bloqueia essencialmente a ativação de MAPK mediada por EGF, TGF- α e/ou HRG tão efetivamente quanto o anticorpo monoclonal murídeo intacto 2C4 (ou um fragmento Fab do mesmo) e/ou liga essencialmente HER2 tão efetivamente quanto o anticorpo monoclonal murídeo intacto 2C4 (ou um fragmento Fab do mesmo). O anticorpo humanizado da presente invenção pode, por exemplo, compreender resíduos de região não humana hipervariável incorporados em um domínio humano pesado variável e pode adicionalmente compreender uma substituição de região de estrutura (FR) em uma posição selecionada a partir do grupo que consiste em 69H, 71H e 73H utilizando o sistema de numeração de domínio variável apresentado em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Em uma modalidade, o anticorpo humanizado compreende as substituições de FR em duas ou em todas as posições de 69H, 71H e 73H.

[0149] Um anticorpo humanizado exemplificador de interesse na presente invenção compreende resíduos de determinação de complementaridade pesados variáveis GFTFTDYTMX, onde X é de preferência D ou S (SEQ ID NO:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:8); e/ou NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), opcionalmente compreende modificações de aminoácido daqueles resíduos de CDR, por exemplo, onde as modificações mantêm ou aperfeiçoam essencialmente a afinidade do anticorpo. Por exemplo,

a variante de anticorpo de interesse pode ter a partir de cerca de uma a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácido nas sequências de CDR pesadas variáveis acima. Tais variantes de anticorpo podem ser preparadas através de maturação de afinidade, por exemplo, conforme descrito abaixo. O anticorpo humanizado mais preferencial compreende a sequência de aminoácido pesada variável na SEQ ID NO:4.

[0150] O anticorpo humanizado pode compreender resíduos de determinação de complementaridade pesados variáveis KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, onde X¹ é de preferência R ou L, X² é de preferência Y ou E, e X³ é preferencialmente T ou S (SEQ ID NO:11); e/ou QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), por exemplo, adicionalmente àqueles resíduos de CDR de domínio pesado variável no parágrafo precedente. Tais anticorpos humanizados opcionalmente compreendem modificações de aminoácido dos resíduos de CDR acima, por exemplo, onde as modificações essencialmente mantêm ou aperfeiçoam a afinidade do anticorpo. Por exemplo, a variante de anticorpo de interesse pode ter a partir de cerca de uma a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácido nas sequências de CDR leve e variável acima. Tais variantes de anticorpo podem ser preparadas através de maturação de afinidade, por exemplo, conforme descrita abaixo. O anticorpo humanizado mais preferencial compreende a sequência de aminoácido de variável leve na SEQ ID NO:3.

[0151] A presente aplicação também contempla os anticorpos maturados de afinidade que se ligam ao HER2 e bloqueiam a ativação de ligante de um receptor HER. O anticorpo parental pode ser um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado, por exemplo, um que compreende as sequências de variáveis pesadas e/ou variáveis leves de SEQ ID Nos. 3 e 4, respectivamente (isto é, variante 574). O anticorpo maturado de afinidade se liga preferencialmente ao receptor HER2 com uma afinidade superior àquela de

variante intacta 574 ou 2C4 murídeo intacto (por exemplo, a partir de cerca de duas ou cerca de quatro dobras, a cerca de 100 dobras ou cerca de 1000 dobras de afinidade aperfeiçoada, por exemplo, conforme avaliada com o uso de domínio extracelular HER2 (ECD) ELISA). Os resíduos de CDR pesados variáveis exemplificadores para a substituição incluem H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete desses resíduos). Os exemplos de resíduos de CDR leves variáveis CDR para alteração incluem L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois a três, quatro, cinco ou acima de dez desses resíduos).

[0152] Várias formas do anticorpo humanizado ou anticorpo maturado de afinidade são contempladas. Por exemplo, o anticorpo humanizado ou anticorpo maturado de afinidade pode ser um fragmento de anticorpo, como um Fab, que é opcionalmente conjugado com um ou mais agente(s) citotóxico(s) com a finalidade de gerar um imunoconjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado ou anticorpo maturado de afinidade pode ser um anticorpo intacto, como um anticorpo IgG1 intacto.

(III) ANTICORPOS HUMANOS

[0153] Como uma alternativa para a humanização, os anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, atualmente é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante a imunização, de produzirem um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene de região (J_H) que se une à cadeia pesada de anticorpo em resultados de camundongos mutantes germinativo e quimérica em inibição completa de produção de anticorpo endógeno. A disposição de transferência do gene de imunoglobina germinativo humano em tais camundongos mutantes germinativos resultará na produção de anticorpos

humanos mediante desafio antígeno. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255 a 258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); e patentes Nos. U.S.5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807.

[0154] Alternativamente, a tecnologia de exibição de fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552 a 553 (1990)) pode ser usado para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios de gene de domínio (V) variável de imunoglobina de doadores não imunizados. De acordo com essa técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados em quadro tanto em um gene de proteína de revestimento menor quanto maior de um bacteriófago filamentosos, como M13 ou fd, e exibidos como fragmentos de anticorpo funcional sobre a superfície da partícula de fago. Devido ao fato de que a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de filamento único a do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam em seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe aquelas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser executada em uma variedade de formatos; para sua revisão, ver, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564 a 571 (1993). Inúmeras fontes de segmentos de gene V podem ser usadas para a exibição de fago. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624 a 628 (1991) isolou uma disposição diversa de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para uma disposição diversa de antígenos (incluindo auto-antígenos) podem ser isolados essencialmente seguindo as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 a 597 (1991), ou Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725 a 734 (1993). Ver, também, patentes Nos. U.S.5.565.332 e

5.573.905.

[0155] Os anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (ver as patentes U.S.5.567.610 e 5.229.275).

[0156] Os anticorpos HER2 humanos são descritos na patente No. U.S.5.772.997 depositada em 30 de Junho de 1998 e WO 97/00271 publicado em 3 de Janeiro de 1997.

(IV) FRAGMENTOS DE ANTICORPO

[0157] Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados através da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto et al, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107 a 117 (1992); e Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem atualmente ser diretamente produzidos por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir das bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de E. coli e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163 a 167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir de cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo estarão aparentes ao profissional versado. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Ver WO 93/16185; Patente No. U.S.5.571.894; e Patente No. U.S.5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um “anticorpo linear”, por exemplo, conforme descrito na patente U.S.5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpo linear podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(V) ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

[0158] Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm

especificidades de ligação para ao menos duas epítomos diferentes. Os anticorpos biespecíficos exemplificadores podem se ligar a duas epítomos diferentes da proteína HER2. Outros tais anticorpos podem combinar um sítio de ligação de HER2 com sítio(s) de ligação para EGFR, HER3 e/ou HER4. Alternativamente, um braço HER2 pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula de acionamento em um leucócito como uma molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo que foque os mecanismos de defesa celular para a célula de expressão de HER2. Os anticorpos biespecíficos também podem ser usados para localizar os agentes citotóxicos para células que expressam HER2. Esses anticorpos possuem um braço de ligação de HER2 e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferona-α, vinca alcalóide, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno isótopo radioativo). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

[0159] WO 96/16673 descreve um anticorpo HER2/FcγRIII biespecífico e a patente No. U.S.5.837.234 revela um anticorpo HER2/FcγRI biespecífico IDM1 (Osidem). Um anticorpo HER2/Fcα biespecífico é mostrado no documento WO98/02463. A patente No. U.S.5.821.337 ensina um anticorpo HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 é um biespecífico HER2-FcγRIII Ab.

[0160] Os métodos para a produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos no estado da técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobina, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537 a 539 (1983)). Devido à distribuição aleatória de cadeia leves e pesadas de imunoglobina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10

moléculas de anticorpo diferentes, as quais somente uma tem a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é usualmente feita através de etapas de cromatografia de afinidade, é especialmente complicada, e o produto produzido é baixo. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829, e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655 a 3659 (1991).

[0161] De acordo com uma abordagem diferente, os domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de antígeno-anticorpo) são fundidos às sequências de domínio constante de imunoglobina. A fusão é preferencialmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobina, que compreende ao menos parte da dobradiça, CH2, e regiões CH3. É preferível ter a primeira região (CH1) constante de cadeia pesada que contendo o sítio necessário para a ligação de cadeia leve, presente em ao menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isso permite que haja grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeo em modalidades quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeo usadas na construção fornecem os melhores rendimentos. Entretanto, é possível inserir as sequências de codificação para duas ou três cadeias de polipeptídeo em um vetor de expressão quando a expressão de ao menos duas cadeias de polipeptídeo em razões iguais resulta em altos rendimentos ou quando as razões não são de significado particular.

[0162] Em uma modalidade preferencial dessa abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada imunoglobina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobina híbrida (fornecendo uma

segunda especificidade de ligação) no outro braço. Revelou-se que essa estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado a partir de combinações de cadeia de imunoglobina não desejada, como a presença de uma cadeia leve de imunoglobina em somente uma metade da molécula biespecífica permite que haja um modo fácil de separação. Essa abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para detalhes adicionais de geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0163] De acordo com outra abordagem descrita na patente No. U.S.5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser projetada para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados a partir de cultura celular recombinante. A interface preferencial compreende ao menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. Nesse método, uma ou mais cadeias pequenas de lado de aminoácido a partir da interface da primeira molécula de anticorpo são recolocadas com cadeias de lado maior (por exemplo, tirosina ou triptofano). As "cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) de lado grande são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo através da substituição de cadeias grandes de lado de aminoácido por cadeias menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso fornece um mecanismo para o aumento da produção do heterodímero sobre outros produtos finais não desejados como homodímeros.

[0164] Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dentre os anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina. Tais anticorpos têm, por exemplo, a proposta de direcionar as células do sistema imunológico para células não desejadas (patente No. U.S.4.676.980), e para o tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Os

anticorpos heteroconjugados podem ser feitos com o uso de quaisquer métodos de reticulação conveniente. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos no estado da técnica, e são descritos na patente No. U.S.4.676.980, junto com uma variedade de técnicas de reticulação.

[0165] As técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo também foram descritas na literatura. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados com o uso de ligação química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) descreve um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteolicamente para gerar fragmentos F(ab')₂. Esses fragmentos são reduzidos na presença do arsenito de sódio de agente de complexo de ditiol para estabilizar ditióis próximos e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são, então, convertidos a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é, então, convertido novamente à Fab'-tiol através da redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

[0166] O progresso recente tem facilitado a recuperação direta de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217 a 225 (1992) descreve a produção de uma molécula F(ab')₂ de anticorpo completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi separadamente secretado a partir de *E. coli* e submetido ao acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico então formado foi capaz de se ligar às células que superexpressam o receptor HER2 e células T humanas normais, assim como foi capaz de acionar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor no seio humano.

[0167] Várias técnicas para a produção e isolamento de

fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente a partir de cultura celular recombinante também foram descritas. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos foram produzidos com o uso de zíperes de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547 a 1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina a partir das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes através de fusão de gene. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de dobradiça para formar monômeros e, então, re-oxidarem para formar os heterodímeros de anticorpo. Esse método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444 a 6448 (1993) fornece um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos compreendem um domínio (V_H) variável de cadeia pesada conectado a um domínio (V_L) variável de cadeia leve através de um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Em conformidade, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados para parear com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, através disso formando dois sítios de ligação de antígeno. Outras estratégias para a produção de fragmentos de anticorpo biespecífico através do uso de dímeros Fv (sFv) de cadeia única também foram relatadas. Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0168] Os anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, os anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(VI) OUTRAS MODIFICAÇÕES DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

[0169] A(s) modificação(ões) da sequência de aminoácidos dos anticorpos HER2 descritas na presente invenção são observadas. Por exemplo, pode ser desejável aperfeiçoar uma afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de

aminoácidos do anticorpo HER2 são preparadas através da introdução de mudanças de nucleotídeo adequadas no interior do ácido nucleico do anticorpo HER2 ou através da síntese de peptídeos. Tais modificações incluem, por exemplo, o apagamento de e/ou inserção no interior de e/ou a substituição de resíduos no interior da sequência de aminoácidos do anticorpo HER2. Qualquer combinação de apagamento, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, dado que a construção final possui as características desejadas. As mudanças do aminoácido podem alterar, também, os processos de pós-tradução do anticorpo HER2, como mudar o número ou posição de sítios de glicosilação.

[0170] Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo HER2 que são lugares preferenciais para a mutagênese é chamado de "mutagênese de varredura de alanina" conforme descrito por Cunningham e Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (por exemplo, resíduos carregados como arg, asp, his, lis, e glu) e substituídos por um aminoácido carregado de forma negativa ou neutro (com mais preferência alanina ou polialanina), a fim de afetar a interação dos aminoácidos com o antígeno HER2. Esses locais de aminoácido que demonstram sensibilidade funcional às substituições são, então, refinados através da introdução de outras variantes ou variantes adicionais no, ou para, os sítios de substituição. Dessa forma, enquanto o sítio para a introdução de uma variação de sequência de aminoácidos é predeterminado, a natureza da mutação *per se* não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, varredura ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as variantes de anticorpo HER2 expressas são triadas para a atividade desejada.

[0171] As inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões terminais carboxila e/ou amino que variam em comprimento a partir de um resíduo a polipeptídeos que contém cem ou mais resíduos, assim como inserções de intra-sequência de resíduos de aminoácidos únicos ou não. Os exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo HER2 com um resíduo metionil de terminal N ou o anticorpo ligado a um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo HER2 incluem a união ao terminal N ou C do anticorpo HER2 a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipeptídeo que aumento a meia vida do soro do anticorpo.

[0172] Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácido. Essas variantes têm, pelo menos, um resíduo de aminoácido na molécula do anticorpo HER2 substituída por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para a mutagênese se substituição incluem as regiões hipervariáveis ou CDRs, mas alterações de regiões FR ou Fc também são contempladas. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 com o título de "substituições preferenciais". Se tais substituições resultarem em uma mudança na atividade biológica, então, mais mudanças substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 1, ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência às classes de aminoácido, poderão ser introduzidas e os produtos triados.

TABELA 1

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferenciais
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

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferenciais
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; Fe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fe	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; Fe; Ala; Norleucina	Leu

[0173] As modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são consumadas através da seleção de substituições que se diferem de forma significativa no efeito a fim de manter (a) a estrutura espinha dorsal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma folha ou conformação helicoidal, (b) a carga ou hidrofobia da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem estar agrupados de acordo com as similaridades nas propriedades das cadeias laterais dos mesmos (em A. L. Lehninger, em *Biochemistry*, segunda edição, páginas. 73 a 75, Worth Publishers, Nova York (1975)):

(1) não polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Fe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar não carregado: Gli (G), Ser (S), Tr (T), Cis (C), Tir (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lis (K), Arg (R), His(H)

[0174] Alternativamente, os resíduos que ocorrem naturalmente podem ser divididos em grupos com base em propriedades de cadeia lateral em comum:

(1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílico neutro: Cis, Ser, Tr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lis, Arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gli, Pro;

(6) aromático: Trp, Tir, Fe.

[0175] As substituições não conservadoras vão conferir a troca a um membro de uma dessas classes por outra classe.

[0176] Qualquer resíduo de cistina não envolvido na preservação da conformação apropriada do anticorpo HER2 pode ser também, substituído em geral por serina, a fim de melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar uma reticulação anormal. Reciprocamente, a(s) ligação(ões) de cistina pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo a fim de aperfeiçoar a estabilidade (em particular onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo como um fragmento de Fv).

[0177] Um tipo particularmente preferencial de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo pai (por exemplo, um anticorpo humano ou humanizado). Em geral, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional irá ter propriedades biológicas aperfeiçoadas em relação ao anticorpo pai, a partir do qual eles são gerados. Uma forma

conveniente de gerar tal variante de substituições envolve o amadurecimento de afinidade com o uso de exibição do fago. Resumidamente, diversos sítios de região hipervariável (por exemplo, 6 ou 7 sítios) são mudados para gerar todas as substituições de amino possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpo geradas dessa forma são exibidas de uma forma monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como uniões ao produto de gene III de M13 empacotado dentro de cada partícula. As variantes de fago mostradas são, então, triadas pela atividade biológica delas (por exemplo, afinidade de ligação) conforme mostrado na presente invenção. A fim de identificar sítios de região hipervariável candidatas para a modificação, a mutagênese de varredura de alanina pode ser executada a fim de identificar resíduos de região hipervariável que contribuem de forma significativa para a ligação do antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico à análise de uma estrutura do cristal do complexo de anticorpo-antígeno para identificar os pontos de contato entre o anticorpo e huma HER2. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para a substituição de acordo com as técnicas elaboradas na presente invenção. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à triagem conforme descrito na presente invenção e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para um desenvolvimento adicional.

[0178] Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Alteração no contexto significa o apagamento de uma ou mais porções de carboidrato encontradas no anticorpo, e/ou a adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

[0179] A glicosilação de anticorpos é tipicamente ligada a N ou ligada a O. A ligada ao N refere-se à ligação da porção de carboidrato à cadeia

lateral de um resíduo de asparagina. A serina de X asparagina de sequências de tripeptídeo e a treonina X asparagina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento da ligação enzimática da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Dessa forma, a presença de qualquer uma dessas sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação em potencial. A glicosilação ligada a O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

[0180] A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é executada convenientemente através da alteração da sequência de aminoácidos, de forma que a mesma contenha uma ou mais das sequências de tripeptídeo mencionadas acima (para sítios de glicosilação ligados a N). A alteração pode ser feita, também, através da adição de, ou substituição de, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação ligados a O).

[0181] Onde o anticorpo compreende uma região Fc, qualquer estrutura de oligossacarídeo ligada ao mesmo pode ser alterada. Por exemplo, os anticorpos com uma estrutura de carboidrato madura que sofre a falta de fucose ligada a uma região Fc do anticorpo são descritos no pedido de patente dos US 2003/0157108 A1, Presta, L. Consulte também US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Os anticorpos com um N-acetilglucosamina dividido em dois (GlcNAc) na estrutura de oligossacarídeo ligada a uma região Fc do anticorpo são citados em WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* e Patente US. 6.602.684, Umana *et al.* Os anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose em uma estrutura de oligossacarídeo ligada a uma região FC do anticorpo são relatados em WO97/30087, Patel *et al.* Consulte também WO98/58964 (Raju, S.) e WO99/22764 (Raju, S.) em relação a anticorpos com

carboidrato alterado ligado à região FC dos mesmos. As composições de anticorpo que compreendem espécies principais de anticorpo com tal estrutura de carboidratos ligada a uma ou duas cadeias pesadas da região FC são observadas na presente invenção.

[0182] As moléculas de ácido nucleico que codificam variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo HER2 são preparadas por diversos métodos conhecidos no estado da técnica. Esses métodos incluem, mas não se limitam a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes da sequência de aminoácidos que ocorrem naturalmente) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou direcionada pelo sítio), mutagênese PCR, e mutagênese de cassete de uma versão de variante ou não variante preparada anteriormente do anticorpo HER2.

(vii) TRIAGEM DE ANTICORPOS COM AS PROPRIEDADES DESEJADAS

[0183] As técnicas para a geração de anticorpos foram descritas acima. É possível selecionar adicionalmente anticorpos com certas características biológicas, conforme desejado.

[0184] Para identificar um anticorpo que bloqueia a ativação do ligante de um receptor HER, a capacidade de o anticorpo bloquear o ligante HER se ligando a células expressando o receptor HER (por exemplo, em conjunto com outro receptor HER com o qual o receptor HER de interesse forma um hetero-oligômero HER) pode ser determinada. Por exemplo, as células que expressam naturalmente, ou transfeccionadas para expressar, o receptor HERs do hetero-oligômero HER podem ser incubadas com o anticorpo e, então, expostas ao ligante HER marcado. A capacidade de o anticorpo HER2 bloquear a ligação do ligante ao receptor HER no hetero-oligômero HER pode ser, então, avaliada.

[0185] Por exemplo, a inibição da ligação HRG às linhagens de célula do tumor de mama MCF7 através de os anticorpos HER2 pode ser

executada com o uso de cultura MCF7 de monocamada em gelo em um formato de placa de 24 poços conforme descrito em WO01/00245. Os anticorpos monoclonais HER2 podem ser adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos. ^{125}I -marcadorHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ (25 pm) pode ser, então, adicionado e a incubação pode ser continuada por 4 a 16 horas. As curvas dosagem-resposta podem ser preparadas e um valor IC₅₀ pode ser calculado para o anticorpo de interesse. Em uma modalidade, o anticorpo que bloqueia a ativação do ligante de um receptor HER terá um IC₅₀ para inibir a ligação de HRG a células MCF7 nesse ensaio de cerca de 50nM ou menos, com mais preferência 10nM ou menos. Onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo como um fragmento de Fab, o IC₅₀ para inibir a ligação HRG a células MCF7 nesse ensaio pode, por exemplo, ser de cerca de 100nM ou menos, com mais preferência 50nM ou menos.

[0186] Alternativamente, ou adicionalmente, a capacidade do anticorpo HER2 de bloquear a fosforilação de tirosina estimulada pelo ligante HER de um receptor HER presente em um hetero-oligômero HER pode ser avaliada. Por exemplo, as células que expressam de maneira endógena o receptor HERs ou transfeccionadas para expressá-los podem ser incubadas com o anticorpo e, então, analisadas para a atividade de fosforilação de tirosina dependente do ligante HER com o uso de um anti-fosfotirosina monoclonal (que é, opcionalmente, conjugado com um marcador detectável). O ensaio de ativação do receptor de quinase descrito na Patente U.S. 5.766.863 também está disponível para a determinação da ativação do receptor HER e bloqueio dessa atividade por um anticorpo.

[0187] Em uma modalidade, um indivíduo pode fazer a triagem de um anticorpo que inibe o estímulo de HRG da fosforilação de tirosina p180 em células MCF7 essencialmente conforme descrito em WO01/00245. Por exemplo, as células MCF7 podem ser plaqueadas em placas de 24 poços e os

anticorpos monoclonais para HER2 podem ser adicionados em cada poço e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente; então o rHRG β ₁₁₇₇₋₂₄₄ pode ser adicionado a cada poço a uma concentração final de 0,2 nM, e a incubação pode ser continuada por 8 minutos. O meio pode ser aspirado a partir de cada poço, e as reações podem ser paradas através da adição de 100 μ l de tampão de amostra SDS (5% de SDS, 25 mM DTT, e 25 mM Tris-HCl, pH 6,8). Cada amostra (25 μ l) pode ser submetida à eletroforese em um gel gradiente de 4 a 12% (Novex) e, então, transferida de forma eletroforese para a membrana difluorida polivinilidina. Os imunoblots de anti-fosfotirosina (a 1 μ g/ml) podem ser desenvolvidos e a intensidade da banda reativa predominante a M_r –180,000 pode ser quantificada através da densitometria de reflexão. O anticorpo selecionado irá inibir, preferencial e significativamente, o estímulo de HRG da fosforilação de tirosina p180 a cerca de 0 a 35% de controle nesse ensaio. Uma curva de dosagem-resposta para a inibição do estímulo de HRG de fosforilação de tirosina p180, conforme determinado pela densitometria de reflexão, pode ser preparada e um IC₅₀ para o anticorpo de interesse pode ser calculado. Em uma modalidade, o anticorpo que bloqueia a ativação do ligante de um receptor HER terá um IC₅₀ para inibir o estímulo de HRG de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio de cerca de 50nM ou menos, com mais preferência 10nM ou menos. Onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo como um fragmento de Fab, o IC₅₀ que inibe o estímulo de HRG de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio pode, por exemplo, ser de cerca de 100nM ou menos, com mais preferência 50nM ou menos.

[0188] Um indivíduo pode, também, avaliar os efeitos inibidores do crescimento do anticorpo em células MDA-MB-175, *por exemplo*, essencialmente conforme descrito em Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997). De acordo com esse ensaio, as células MDA-MB-175 podem ser tratadas com um anticorpo monoclonal HER2 (10 μ g/mL) por 4 dias e colorida

com cristal violeta. A incubação com um anticorpo HER2 pode mostrar um efeito inibidor de crescimento nessa linhagem de célula similar ao exibido pelo anticorpo monoclonal 2C4. Em uma modalidade adicional, o HRG exógeno não irá reverter essa inibição de forma significativa. De preferência, o anticorpo será capaz de inibir a proliferação celular de células MDA-MB-175 em uma extensão maior do que o anticorpo monoclonal 4D5 (e, opcionalmente, em uma extensão maior do que o anticorpo monoclonal 7F3), ambos na presença e ausência de HRG exógeno.

[0189] Em uma modalidade, o anticorpo HER2 de interesse pode bloquear associação dependente de heregulina de HER2 com HER3 em ambas as células MCF7 e SK-BR-3, conforme determinado em um experimento de co-imunoprecipitação como o descrito em WO01/00245, substancialmente mais eficaz que o anticorpo monoclonal 4D5, e de preferência substancialmente mais eficaz que o anticorpo monoclonal 7F3.

[0190] Para identificar os anticorpos HER2 inibidores de crescimento, um indivíduo pode fazer uma triagem dos anticorpos que inibem o crescimento de células de câncer que superexpressam o HER2. Em uma modalidade, o anticorpo inibidor de crescimento recomendado é capaz de inibir o crescimento de células SK-BR-3 na cultura de célula em cerca de 20 a 100% e, de preferência, em cerca de 50 a 100% em uma concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar tais anticorpos, o ensaio SK-BR-3 descrito na Patente de número U.S. 5.677.171 pode ser executado. De acordo com esse ensaio, a cultura das células SK-BR3 é feita em uma mistura 1:1 de F12 e meio de DMEM suplementado com 10% de soro de feto bovino, glutamina e estreptomicina penicilina. As células SK-BR-3 são plaqueadas em 20.000 células em uma placa para cultura de célula de 35mm (placa de 2mls/35mm). 0,5 a 30 µg/ml do anticorpo HER2 é adicionado por placa. Após seis dias, o número de células, comparado a células não tratadas, é contado

com o uso de um contador de célula eletrônico COULTER^J. Esses 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 de crescimento. Consulte Patente de número U.S. 5.677.171 para ensaios de triagem para o anticorpo inibidor de crescimentos, como 4D5 e 3E8.

[0191] Com o intuito de selecionar os anticorpos que induzem a apoptose, um ensaio de ligação de anexina com o uso de células BT474 está disponível. Depois da cultura, as células BT474 são distribuídas em placas, conforme discutido no parágrafo anterior. O meio é, então, removido e substituído por somente um meio novo ou um meio que contém 10µg/ml de anticorpo monoclonal. Após um período de incubação de três dias, as monocamadas são lavadas com PBS e separadas por tripsinização. As células são, então, centrifugadas, suspensas novamente em tampão de ligação Ca^{2+} e divididas em partes iguais em tubos, conforme discutido acima no ensaio da morte da célula. Os tubos receberam, então, anexina marcada (por exemplo, anexina V-FTIC) (1µg/ml). As amostras podem ser analisadas com o uso de um citômetro de fluxo FACSCAN^J e o programa CélulaQuest FACSCONVERTTM (Becton Dickinson). Esses anticorpos que induzem estatisticamente níveis significantes de ligação de anexina em relação ao controle são selecionados como anticorpos que induzem a apoptose. Em adição ao ensaio de ligação de anexina, um ensaio de coloração de DNA com o uso de células BT474 está disponível. A fim de executar esse ensaio, as células BT474, que foram tratadas com o anticorpo de interesse, conforme descrito nos dois parágrafos anteriores, são incubadas com 9µg/ml de HOECHST 33342TM por duas horas a 37°C, e foram, então, analisadas em um citômetro de fluxo EPICS ELITETM (Coulter Corporation) com o uso do programa MODFIT LTTM (Verity Software House). Os anticorpos que induzem uma mudança na porcentagem de células apoptóticas, que é o dobro ou mais (e, de preferência, três vezes ou mais) do

que as células não tratadas (até 100% de células apoptóticas), podem ser selecionados como anticorpos pro-apoptóticos com o uso desse ensaio. Consulte WO98/17797 para ensaios de triagem de anticorpos que induzem a apoptose, como 7C2 e 7F3.

[0192] Para fazer a triagem de anticorpos que se ligam a um epítipo na ligação HER2 por um anticorpo de interesse, um ensaio de rotina de bloqueio cruzado como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser executado para avaliar se o anticorpo bloqueia de forma cruzada liga um anticorpo, como 2C4 ou Pertuzumab, ao HER2. Alternativamente, ou adicionalmente, o mapeamento de epítipo pode ser executado através de métodos conhecidos no estado da técnica e/ou um indivíduo pode estudar o a estrutura do anticorpo HER2 (Franklin *et al.* *Cancer Célula* 5:317-328 (2004)) para ver qual(is) domínio(s) de HER2 é/são ligados ao anticorpo.

(VIII) IMUNOCONJUGADOS

[0193] A presente invenção também aborda os imunoconjugados que compreendem um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, como um agente quimioterápico, toxina (por exemplo, uma toxina de molécula pequena ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes dos mesmos), ou um isótopo radioativo (*isto é*, um radioconjugado).

[0194] Os agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Os conjugados de um anticorpo e de uma ou mais toxinas de molécula pequenas, como uma caliqueamicina, uma maitansina (Patente de número U.S. 5.208.020), um tricoteno, e CC1065 também são observados na presente invenção.

[0195] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, o anticorpo é conjugado a uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo,

cerca de 1 a cerca de 10 moléculas de maitansina por molécula de anticorpo). A maitansina pode, por exemplo, ser convertida para May-SS-Me que pode ser reduzida para May-SH3 e reagida com o anticorpo modificado (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) a fim de gerar um imunocjugado de anticorpo de maitansinóide.

[0196] Outro imunocjugado de interesse compreende um anticorpo HER2 conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir intervalos de DNA de cadeia dupla em concentrações sub-picomolar. Os análogos estruturais de caliqueamicina, que podem ser usados, incluem, mas não se limitam a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetila- 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)). Consulte também, Patente de número US 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; e 5.773.001 incorporadas expressamente na presente invenção a título de referência.

[0197] As toxinas enzimaticamente ativas e os fragmentos das mesmas, que podem ser usados, incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de acina, cadeia A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor momordica charantia, curcina, crotina, inibidores de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Consulte, por exemplo, WO 93/21232 publicado em 28 de outubro de 1993.

[0198] A presente invenção aborda, adicionalmente, um imunocjugado formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA como uma desoxirribonuclease; DNase).

[0199] Uma variedade de isótopos radioativos está disponível

para a produção de anticorpos HER2 radioconjugados. Os exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e radioativos isótopos de Lu.

[0200] Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser produzidos com o uso de uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometila) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (como dimetila adipimidato HCL), ésteres ativos (como suberato de disuccinimidila), aldeídos (como glutarealdeído), compostos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoila) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazoniumbenzoila)-etilenediamina), diisocianatos (como tolieno 2,6-diisocianato), e compostos ativos de bis-fluorina (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotóxica de ricina pode ser preparada conforme descrito em Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). O carbono-14 marcado por ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminepentaacético (MX-DTPA) é um agente quelante exemplar para a conjugação de radionucleotídeo do anticorpo. Consulte WO94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" que facilita a liberação da droga citotóxica no interior da célula. Por exemplo, um ligante de ácido lábil, ligante sensível a peptidase, ligante dimetila ou ligante que contém dissulfeto (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) podem ser usados.

[0201] Alternativamente, uma proteína de fusão que compreende o anticorpo HER2 e o agente citotóxico pode ser produzida, por exemplo, através de técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos.

[0202] Ainda em outra modalidade, o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (como estreptavidina) para ser utilizado na pré-marcação do tumor em que o conjugado receptor de anticorpo é administrado no paciente, seguido da remoção de conjugado não ligado à circulação com o

uso de um agente de limpeza e, então, a administração de um "ligante" (por exemplo, avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo).

(IX) OUTRAS MODIFICAÇÕES DE ANTICORPO

[0203] Outras modificações do anticorpo são observadas na presente invenção. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a um dentre uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo pode, também, ser capturado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de acumulação ou através de polimerização interfacial (por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), em sistemas de entrega de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são apresentadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Oslo, A., Ed., (1980).

[0204] A modificação do anticorpo da presente invenção pode ser desejável em relação à função causadora, *por exemplo*, de forma que aumente a citotoxicidade mediada pela célula dependente de antígeno (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isso pode ser alcançado através da introdução de uma ou mais substituições de aminoácido em uma região FC do anticorpo. Alternativamente, ou adicionalmente, o(s) resíduo(s) de cistina pode ser introduzido na região FC permitindo, assim, a formação de ligação dissulfeto de intercadeia. O anticorpo homodimérico gerado dessa forma pode ter uma capacidade de internalização melhorada e/ou extermínio de célula mediado por um complemento melhorado e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Consulte Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922

(1992). Os anticorpos homodiméricos com atividade anti-tumor melhorada também podem ser preparados com o uso de reticuladores heterobifuncionais conforme descrito em Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser projetado com duas regiões FCs e pode, através delas, ter lise de complemento melhorado e capacidades de ADCC. Consulte Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

[0205] WO00/42072 (Presta, L.) descreve os anticorpos com função de ADCC melhoradas na presença de células causadoras humanas, onde os anticorpos compreendem substituições de aminoácido na região FC dos mesmos. De preferência, o anticorpo com ADCC melhorado compreende substituições nas posições 298, 333, e/ou 334 da região FC. De preferência, a região FC alterada é uma região FC de IgG1 humana que compreende ou consistem em substituições em uma, duas ou três dessas posições.

[0206] Os anticorpos com ligação de C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) são descritos em WO99/51642, Patente de número US 6.194.551B1, Patente de número U.S. 6.242.195B1, Patente de número U.S. 6.528.624B1 e Patente de número U.S. 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Os anticorpos compreendem uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da região FC dos mesmos.

[0207] Para aumentar a meia vida do soro do anticorpo, um indivíduo pode incorporar um epítopo de ligação receptora salvado dentro do anticorpo (em especial um fragmento de anticorpo) conforme descrito em Patente U.S. 5.739.277, por exemplo. Como usado na presente invenção, o termo "epítopo de ligação receptora salvado" refere-se a um epítopo da região FC de uma molécula IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável por aumentar a meia vida do soro *in vivo* da molécula IgG. Os anticorpos com substituições em uma região FC dos mesmos e meia vida de

soro aumentada também são descritos em WO00/42072 (Presta, L.).

[0208] Os anticorpos projetados com três ou mais (de preferência quatro) sítios de ligação de antígeno funcional também são observados (Pedido número US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

[0209] Os anticorpos HER2 apresentados na presente invenção podem ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas que contém o anticorpo são preparados através de métodos conhecidos no estado da técnica, tais como o 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 de número U.S. 4.485.045 e 4.544.545; e WO97/38731 publicado em 23 de outubro de 1997. Os lipossomas com tempo de circulação melhorado são apresentados em Patente de número U.S. 5.013.556.

[0210] Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados através do método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídio que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros com tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas, conforme descrito em Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de uma reação de troca de dissulfeto. Um agente quimioterápico é contido, opcionalmente, dentro do lipossoma. Consulte Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

IV. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

[0211] As formulações terapêuticas das composições da presente invenção são preparadas para armazenamento através da mistura da composição com veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Oslo,

A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os veículos, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de amônia octadecildimetilbenzila; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenol, butila ou benzila; parabenos alquila como parabeno metila ou propila; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos com baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina em soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes como EDTA; açúcares como sucrose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons que formam sais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não iônicos como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG). As formulações de anticorpo HER2 liofilizadas são descritas em WO 97/04801. As formulações particularmente preferenciais para a presente composição são descritas em US20006/088523.

[0212] A formulação na presente invenção pode conter, ainda, mais que um composto ativo conforme necessário para a indicação particular sendo tratada, de preferência aquelas com atividades complementares que não afetam de forma adversa, uma à outra. Por exemplo, pode ser desejável o fornecimento adicional de anticorpos que se ligam a EGFR, HER2 (por exemplo, um anticorpo que liga um epítipo diferente a HER2), HER3, HER4, ou fator endotelial vascular (VEGF) na formulação. Alternativamente, ou adicionalmente, a composição pode compreender, adicionalmente, um agente quimioterápico, agente citotóxico, citocina, agente inibidor de crescimento,

agente anti-hormonal, droga direcionada ao EGFR, agente antiangiogênico, inibidor de tirosina quinase, e/ou cardioprotetor. Tais moléculas estão presentes de forma adequada em combinações em quantidades que são eficazes para o propósito em questão.

[0213] Os ingredientes ativos podem, ainda, ser colocados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através das técnicas de acumulação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são apresentadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Oslo, A. Ed. (1980).

[0214] As preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Os exemplos adequados das preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, cujas matrizes possuem a forma de artigos modelados, *por exemplo*, filmes ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação prolongadas incluem poliésteres, hidrogeis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (Patente de número U.S. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e glutamato γ etil-L, acetato de etileno vinil não degradável, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradáveis como o LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0215] As formulações que serão usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é prontamente alcançado através da filtração através de membranas de filtração estéril.

V. TRATAMENTO COM A COMPOSIÇÃO DE ANTICORPO HER2

[0216] É observado que, de acordo com a presente invenção, o anticorpo HER2 pode ser usado no tratamento de câncer. O câncer irá, em geral, ser positivo para HER2, de forma que o anticorpo HER2 na presente invenção é capaz de se ligar às células de câncer. Em uma modalidade, o câncer expressa baixa de HER3 (por exemplo, câncer de ovário) ou tem uma razão de HER2:HER3 elevada (por exemplo, câncer de ovário). Diversos cânceres que podem ser tratados com a composição estão listados nas seções de definições acima.

[0217] Os cânceres preferenciais para serem tratados na presente invenção incluem: câncer de mama, incluindo positivo para HER2 câncer de mama, combinado opcionalmente com trastuzumab e um taxóide como docetaxel, e incluindo terapia por neoadjuvante de câncer de mama; câncer de ovário (incluindo o câncer de ovário resistente a platina e sensível a platina) (consulte US2006/0013819, por exemplo); câncer de pulmão (incluindo câncer de pulmão de célula não pequena, NSCLC), combinado, opcionalmente, com um inibidor de EGFR (consulte US 2007/0020261, por exemplo); câncer colorretal, etc.

[0218] Observa-se também que o anticorpo HER2 pode ser usado no tratamento de diversas doenças ou distúrbios não malignos, como doença autoimune (por exemplo, psoríase); endometriose; escleroderma; restenose; pólipos como pólipos no cólon, pólipos nasais ou pólipos gastrointestinais; fibroadenoma; doença respiratória; colecistite; neurofibromatose; doença de rim policístico; doenças inflamatórias; distúrbios de pele incluindo psoríase e dermatite; doença vascular; condições que envolvem a proliferação anormal de células epiteliais vasculares; úlceras gastrointestinais; doença de Ménétrier, adenomas secretores ou síndrome de perda de proteína; distúrbios renais; distúrbios angiogênicos; doenças oculares como degeneração macular

relacionada à idade, síndrome de histoplasmoses ocular presumida, neovascularização retinal de retinopatia diabética proliferativa, vascularização retinal, retinopatia diabética ou degeneração macular relacionada à idade; patologias associadas ao osso como osteoartrite, raquitismo e osteoporose; danos causados por um evento de isquemia cerebral; doenças fibróticas ou de edema como cirrose hepática, fibrose de pulmão, carcinosarcoma, tireoidite, síndrome de hiperviscosidade sistêmica, doença de Osler Weber-Rendu, doença pulmonar oclusiva crônica ou edema seguintes a queimaduras, trauma, radiação, derrame, hipoxia ou isquemia; reação de hipersensibilidade da pele; retinopatia diabética e nefropatia diabética; síndrome de Guillain-Barre; doença do enxerto contra hospedeiro ou rejeição a transplante; doença de Paget; inflamação do osso ou juntas; envelhecimento da pele ocasionado por raios (por exemplo, causado por radiação UV da pele humana); hipertrofia prostática benigna; certas infecções por micróbios incluindo patógenos microbianos selecionados a partir de adenovírus, hantavírus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. e *Bordetella pertussis*; trombose causada por agregação de plaquetas; condições reprodutivas como endometriose, síndrome da hiperestimulação do ovário, pré-eclâmpsia, sangramento uterino disfuncional ou menometrorragia; sinovite; ateroma; nefropatias agudas e crônicas (incluindo glomerulonefrite proliferativa e doença renal induzida por diabetes); eczema; formação de cicatriz hipertrófica; choque endotóxico e infecção por fungo; polipose adenomatosa familiar; doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Alzheimer, demência decorrente de AIDS, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, retinite pigmentosa, atrofia muscular espinhal e degeneração cerebelar); síndrome mielodisplásica; anemia aplástica; dano isquêmico; fibrose do pulmão, rim ou fígado; doença de hipersensibilidade mediada pela célula; estenose pilórica hipertrófica infantil; síndrome de obstrução urinária; artrite psoriática; e tireoidite de Hashimoto. As indicações

preferenciais não malignas para a terapia na presente invenção incluem psoríase, endometriose, escleroderma, doença vascular (por exemplo, restenose, aterosclerose, doença da artéria coronária, ou hipertensão), pólipos no cólon, fibroadenoma ou doença respiratória (por exemplo, asma, bronquite crônica, bronquiectasia ou fibrose cística).

[0219] O tratamento com o anticorpo HER2 irá resultar em uma melhora nos sinais ou sintomas da doença. Por exemplo, onde a doença sendo tratada é câncer, tal terapia pode resultar em uma melhora na sobrevivência (sobrevivência geral e/ou sobrevivência livre de progressão) e/ou pode resultar em uma resposta clínica objetiva (parcial ou completa).

[0220] De preferência, o anticorpo HER2 na composição administrada é um anticorpo nu. Entretanto, o anticorpo HER2 administrado pode ser conjugado com um agente citotóxico. De preferência, o imunoconjugado e/ou proteína HER2 no qual o mesmo é ligado é/são internalizado(s) pela célula, resultando em uma eficácia terapêutica aumentada do imunoconjugado no extermínio de célula de câncer na qual o mesmo é ligado. Em uma modalidade preferencial, o agente citotóxico marca ou interfere no ácido nucleico dentro da célula de câncer. Os exemplos de tais agentes citotóxicos incluem maitansinóides, caliqueamicinas, ribonucleases e endonucleases de DNA.

[0221] O anticorpo HER2 é administrado em um paciente humano de acordo com métodos conhecidos, como administração intravenosa, por exemplo, como uma pílula grande ou através da infusão contínua por um período de tempo, por vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intra-articular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica ou de inalação. A administração intravenosa da composição do anticorpo é preferencial.

[0222] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem adequada do anticorpo HER2 irá depender do tipo de doença a ser tratado,

conforme definido acima, a gravidade e curso da doença, quer que o anticorpo HER2 tenha sido administrado com propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, o histórico clínico do paciente e resposta ao anticorpo HER2 e a discricção do médico responsável. O anticorpo HER2 é administrado de forma adequada ao paciente de uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 50mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20mg/kg) do anticorpo HER2 é uma dosagem candidata inicial para administração no paciente, seja, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Em uma modalidade, o tempo de infusão inicial do anticorpo HER2 pode ser mais longo do que os tempos de infusão subsequentes, por exemplo, aproximadamente 90 minutos para a infusão inicial, e aproximadamente 30 minutos para as infusões subsequentes (se a infusão inicial for bem tolerada). A dosagem preferencial do anticorpo HER2 estará na faixa de cerca de 0,05mg/kg a cerca de 10mg/kg. Dessa forma, uma ou mais dosagens de cerca de 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg ou 10mg/kg (ou qualquer combinação das mesmas) podem ser administradas no paciente. Tais dosagens podem ser administradas de forma intermitente, *por exemplo*, toda semana ou a cada três semanas (*por exemplo*, de forma que o paciente receba de cerca de duas a cerca de vinte, *por exemplo*, cerca de seis dosagens do anticorpo HER2). Uma dosagem inicial alta, seguida por uma ou mais dosagens mais baixas pode ser administrada. Em uma modalidade, o anticorpo HER2 é administrado como uma dosagem de carga de aproximadamente 840 mg seguida de aproximadamente 420 mg administrada, aproximadamente, a cada três semanas. Em outra modalidade, o anticorpo HER2 é administrado como uma dosagem de carga de aproximadamente 1050mg, seguida de aproximadamente 525mg administrada, aproximadamente, a cada três semanas.

[0223] Outros agentes terapêuticos podem ser combinados com o

anticorpo HER2. Tal administração combinada inclui a co-administração ou administração coexistente, com o uso de formulações separadas ou uma formulação farmacêutica única, e administração consecutiva em qualquer ordem, em que, de preferência, exista um período de tempo enquanto ambos (ou todos) agentes ativos exerçam, de forma simultânea, as atividades biológicas dos mesmos. Dessa forma, o outro agente terapêutico pode ser administrado antes, ou a seguir, da administração do anticorpo HER2. Nessa modalidade, o tempo entre pelo menos uma administração do outro agente terapêutico e, pelo menos, uma administração do anticorpo HER2 e, de preferência, de aproximadamente 1 mês ou menos e, com mais preferência, de aproximadamente 2 semanas ou menos. Alternativamente, o outro agente terapêutico e o anticorpo HER2 são administrados ao mesmo tempo no paciente, em uma formulação única ou formulações separadas.

[0224] Os exemplos de outros agentes terapêuticos que podem ser combinados com o anticorpo HER2 incluem qualquer um ou mais de: um agente quimioterápico, como um anti-metabolito, *por exemplo*, gemcitabina; um segundo anticorpo HER2 diferente (por exemplo, um anticorpo inibidor de crescimento HER2, como Trastuzumab, ou um anticorpo HER2 que induz a apoptose de uma célula com superexpressão de HER2, como 7C2, 7F3 ou variantes de origem humana dos mesmos); um segundo anticorpo direcionado contra outro tumor associado ao antígeno, como EGFR, HER3, HER4; composto anti-hormonal, *por exemplo*, um composto anti-estrogênio como tamoxifeno, ou um inibidor de aromatase; um cardioprotetor (para evitar ou reduzir qualquer disfunção do miocárdio associado com a terapia); uma citocina; uma droga direcionada para EGFR (como Erlitonib, Gefitinib, ou Cetuximab); um agente antiangiogênico (especialmente Bevacizumab vendido por Genentech sob a marca registrada AVASTIN®); um inibidor de tirosina quinase; um Inibidor de COX (por exemplo, um inibidor de COX-1 ou COX-2);

droga anti-inflamatória não esteroide (AINE), Celecoxib (CELEBREX[®]); inibidor de farnesil transferase (por exemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA[®] R115777 disponíveis pela marca Johnson e Johnson ou Lonafarnib SCH66336 disponível pela marca Schering-Plough); o anticorpo que liga a proteína oncofetal CA 125 como Oregovomab (MoAb B43.13); vacina HER2 (como vacina HER2 AutoVac de Pharmexia, ou vacina de proteína APC8024 de Dendreon, ou vacina de peptídeo HER2 de GSK/Corixa); outra terapia direcionada por HER (*por exemplo*, trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc); inibidor de Raf e/ou ras (consulte, por exemplo, WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; um medicamento que trata a náusea como um antagonista, esteróide ou benzodiazepina de serotonina; um medicamento que evita ou trata erupção de pele ou terapias contra acne padrões, incluindo antibiótico tópico ou oral; um medicamento que reduz a temperatura do corpo como acetaminofeno, difenidramina, ou meperidina; fator de crescimento hematopoético, etc.

[0225] As dosagens adequadas para qualquer um dos agentes coadministrados acima são as usadas atualmente e podem ser diminuídas devido à ação combinada (sinergia) do agente e anticorpo HER2. O tratamento com a combinação da composição do anticorpo HER2 e outro agente terapêutico pode resultar em um benefício terapêutico sinérgico, ou maior do que adicional, para o paciente. Se um agente quimioterápico é administrado, o mesmo é, normalmente, administrado em dosagens conhecidas por isso, ou opcionalmente diminuídas devido à ação combinada das drogas ou efeitos colaterais atribuíveis à administração do agente quimioterápico. Os calendários de preparação e dosagem de tais agentes quimioterápicos podem ser usados de acordo com as instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente pelo profissional versado. Os calendários de preparação e dosagem para tal quimioterapia também são descritos em Chemotherapy

Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0226] Em adição aos regimes terapêuticos acima, o paciente pode ser submetido a remoção cirúrgica das células de câncer e/ou radioterapia.

VII. DEPÓSITO DE MATERIAIS

[0227] As linhagens de células hibridoma seguintes foram depositadas com o American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Designação do 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

[0228] Os detalhes adicionais da presente invenção são ilustrados pelo Exemplo não limitador a seguir. As apresentações de todas as citações da especificação estão expressamente incorporadas na presente invenção a título de referência.

EXEMPLO 1

[0229] Esse exemplo descreve a caracterização de uma composição que compreende espécies principais de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II de HER2 (pertuzumab) e variantes de ácido do mesmo.

[0230] Pertuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, gerado com base na estrutura do de IgG1(κ) humano. O mesmo compreende duas cadeias pesadas (448 resíduos) e duas cadeias leves (214 resíduos). As duas cadeias pesadas são ligadas por dois dissulfetos de inter cadeia, sendo que cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada através de um dissulfeto de inter cadeia. Existe um sítio de glicosilação ligado a N na região FC de pertuzumab a Asn-299 das duas cadeias pesadas. O pertuzumab

difere do HERCEPTINTM (Trastuzumab) nas regiões de ligação do epítopo de cadeia leve (12 diferenças em aminoácido) e a cadeia pesada (30 diferenças em aminoácido). Como resultado dessas diferenças, o pertuzumab se liga a um epítopo completamente diferente no receptor HER2. A ligação do pertuzumab ao receptor HER2 nas células epiteliais humanas evita que o mesmo forme complexos com outros membros da família do receptor HER (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)). Ao bloquear a formação do complexo, o pertuzumab evita o efeito de estimulação de crescimento dos ligantes nos experimentos de complexos (*por exemplo*, EGF e heregulina). Os experimentos *In vitro* demonstraram que tanto o pertuzumab quanto o pertuzumab-Fab inibem a ligação de heregulina (HRG) às células MCF7, e que a fosforilação estimulada por HRG do complexo HER2-HER3 pode ser inibida tanto pelo pertuzumab quanto pelo pertuzumab-Fab (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)). Adicionalmente, revelou-se que a inibição *in vivo* do crescimento do tumor através de pertuzumab e de um polietileno glicol derivado de Fab de pertuzumab são compráveis em um modelo de xenoenxerto para câncer de próstata murídeo (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)). Esses dados sugerem que a região FC do anticorpo não é necessária para inibição do crescimento do tumor e, além disso, as funções causadoras mediadas por FC e bivalência não são necessárias para a atividade biológica *in vivo* ou *in vitro*.

[0231] Nesse exemplo, o pico principal de pertuzumab foi coletado a partir de uma coluna de troca de cátion e incubado no meio de cultura da célula ou processado com o uso de operações de purificação de anticorpo padrões. As variantes ácidas são formadas sob incubação do pico principal com os componentes do meio de cultura da célula. As variantes ácidas de anticorpos monoclonais são formas modificadas do produto desejado que elui mais cedo do que o pico principal sob separação por cromatografia de troca de cátion. As diferenças sutis na quantidade e/ou distribuição de variantes ácidas

são observadas, muitas vezes, antes e após as mudanças do processo e criam um desafio para demonstrar a possibilidade de comparação do produto. As operações de purificação tiveram um efeito pequeno na formação de variantes ácidas. As variantes identificadas na fração variante de ácido incluem variante glicada, variante deamidada, variante dissulfeto reduzida, variante sialilada, e variante não reduzível. Coletivamente, as variantes ácidas tinham potência total.

[0232] Entre outras coisas, o propósito desse estudo era: entender melhor o impacto da cultura da célula e processos de recuperação na formação da variante de pertuzumab de ácido, caracterizar as variantes ácidas predominantes de pertuzumab, e avaliar o impacto de variantes ácidas em farmacocinética (PK).

[0233] Os resultados da farmacocinética em ratos mostram que a área sob a curva para a fração variante de ácido e fração de pico principal era equivalente ao material de partida de pertuzumab (com razão de média geométrica de 0,96 e 0,95, respectivamente). Esses resultados demonstram que embora as variantes ácidas sejam quimicamente diferentes do pico principal, elas têm farmacocinética equivalente.

MÉTODOS E RESULTADOS

[0234] A Figura 10 descreve o projeto experimental para o isolamento da troca de cátion de MP (Pico principal) e AV (Variantes ácidas), a cultura de célula, recuperação, e avaliação de PK (farmacocinética) e testes analíticos. Meios fresco = meio padrão; meio gasto = meio padrão após 12 dias de cultura da célula, as células foram removidas através de centrifugação. O oxigênio dissolvido, pH, e outros parâmetros não foram controlados.

A. ISOLAMENTO DO PICO PRINCIPAL E VARIANTES ÁCIDAS

[0235] As variantes de carga de pertuzumab foram separadas em uma coluna (CEX) de troca de cátion DIONEX PROPAC WCX-10® de 4,0 x 250

mm com o uso das condições seguintes:

Tampão A: 20mM BisTris, pH 6,0

Tampão B: 20mM BisTris, 200mM NaCl, pH 6,0

Gradiente: 0,5% B /min entregue em 1,0 mL/min

Temperatura de coluna: 35^{NC}

Detecção: 280 nm

[0236] Um cromatograma típico é mostrado na Figura 11. As frações de AV (variante de ácido) e MP (pico principal) foram coletadas.

[0237] O conteúdo de monômero e potência foi semelhante entre o material de partida de pertuzumab, pico principal e variantes ácidas (Tabela B). A pureza das frações CEX de variante de ácido e pico principal foi aceitável para estudos de farmacocinética com base no critério de 90% de pureza por CEX (Tabela B).

TABELA B

Análise do material de partida Pertuzumab e fração CEX			
Análise	Material de partida	Pico principal	Variantes ácidas
CEX (%AV, %MP, %BV)	21, 68, 12	5, 93, 2	95, 4, 2
Potência	94 (ave. n=2)	109	92
SEC (% monômero)	99,9	99,9	100

B. EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE PICO PRINCIPAL

[0238] O pico principal de Pertuzumab isolado pelo CEX foi adicionado em um ou meio de cultura da célula (sem células) fresco ou gasto e incubado por 12 dias a 37^{NC} conforme descrito na Figura 10. As amostras em diversos pontos de tempo foram analisadas de forma direta por CEX ou após o isolamento por proteína A. O pico principal também foi adicionado em meios +/- e diversos componentes de meios como glicose e peptona. Em adição, o pico principal foi processado através de operações de recuperação padrões como cromatografia de proteína A (ProA), tratamento com Ph baixo e SP Sepharose

Fast Flow (SPFF) para ciclos múltiplos e analisado por CEX.

[0239] Os perfis de CEX do pico principal incubado por 12 dias em meio fresco ou gasto foram similares (Figura 13 e Tabela C). O pico principal diminuiu mais após a incubação em meios frescos do que após a incubação em meio gasto.

[0240] A remoção de diversos componentes de meio afetou a diminuição do pico principal.

[0241] A porcentagem do pico principal em amostras incubadas foi a mesma com e sem o isolamento da proteína A. A incubação apenas em tampão de meio ocasionou uma perda do pico principal.

[0242] O isolamento de proteína A do pico principal a partir do meio não afetou o perfil de CEX demonstrando que as modificações durante a incubação não afetam a eluição ou ligação da proteína A. As operações de recuperação tiveram pouco efeito, ou efeito nenhum, na porcentagem do pico principal CEX.

C. CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES ÁCIDAS

[0243] As variantes ácidas de Pertuzumab foram isoladas por CEX a partir do material de partida de pertuzumab ou pico principal incubado em meio de cultura da célula as variantes ácidas isoladas foram analisadas pelos métodos listados na Tabela D. As variantes ácidas compreendem 21% da área de pico total, portanto cerca de 80% (17% de 21%) de variantes ácidas foram identificadas. As formas deamidadas não puderam ser quantificadas.

TABELA D

Métodos para caracterização das variantes ácidas	
Método	Variantes detectadas*
CEX +/- tratamento com sialidase	6% sialilada
CE-SDS reduzida	1,5% reduzida incompletamente

Métodos para caracterização das variantes ácidas	
Método	Variantes detectadas*
CE-SDS não reduzida	6% dissulfeto reduzida
Cromatografia boronato	3,5% glicada (ordem superior)
Mapeamento de peptídeo	Deamidada

*Porcentagem da área de pico CEX total.

[0244] As formas identificadas nas variantes ácidas geradas pelo pico principal incubado com o meio foram as mesmas que às identificadas no material de partida de pertuzumab. As formas seguintes foram detectadas: variante sialilada, variante dissulfeto reduzida, variante glicada, variante não reduzível e variante deamidada. As formas glicadas de ordem maior foram identificadas por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) após tratamento de PNGase e redução.

D. ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA (PK)

[0245] Uma dosagem única intravenosa (IV) de 10 mg/kg, 12 ratos por braço, 3 braços (variantes ácidas, pico principal, material de partida de pertuzumab). A amostra de PK extensiva foi conduzida por 35 dias. A Razão de Média Geométrica de AUC (dia 0 a 14) entre material de partida de pertuzumab, pico principal e de ácido. A razão de média geométrica = Amostra GM/Material de partida de GM IgG1. A concentração de Pertuzumab versus a curva de tempo foi similar para o material de partida de pertuzumab, variante de ácido, e pico principal (Figura 16 e Tabela E). Nenhuma diferença significativa foi observada na exposição entre variantes ácidas, pico principal, e material de partida de pertuzumab. O GMR foi ~1,0 com 90% de CI entre 0,80 a 1,25.

TABELA E

Área abaixo da curva (AUC) e razões da média geométrica do estudo farmacocinético		
Material teste (n= 12 para cada grupo)	AUC0-14 (dia.µg/mL)	
	Média ± DP	Média geométrica
		Razão da média geométrica (CI)

Área abaixo da curva (AUC) e razões da média geométrica do estudo farmacocinético			
Variante ácida	910 ± 73,1	907	0,963 (0,905, 1,03)
Pico principal	895 ± 85,5	891	0,946 (0,884, 1,01)
Material de partida Pertuzumab	946 ± 94,6	942	NA

CONCLUSÕES

[0246] Os fatores de cultura da célula múltiplos contribuem para a formação de variante de ácido, mas a recuperação não foi mostrada realização da formação de variante de ácido. As variantes dissulfeto reduzida, não reduzível, sialilada, glicada e deamidada foram identificadas na fração de ácido. A fração de ácido isolada do material de partida de pertuzumab e aqueles gerados por incubação de pico principal de CEX continham as mesmas formas. As variantes ácidas, pico principal e material de partida de pertuzumab tinham a mesma farmacocinética.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender uma espécie principal de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II de HER2 e compreende sequências de aminoácidos de cadeia leve e cadeia pesada nas SEQ ID Nos. 15 e 16, respectivamente, e variantes ácidas da espécie principal de anticorpo HER2, em que as variantes ácidas incluem variante glicada, variante dissulfeto reduzida, e variante não reduzível, em que a espécie principal de anticorpo HER2 é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição, e a espécie principal de anticorpo HER2 e as variantes ácidas são todos anticorpos intactos.

2 COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas variantes ácidas compreenderem adicionalmente variante deamidada e variante sialilada.

3. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pela quantidade das variantes ácidas ser menor do que 25%.

4. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada por compreender uma variante de extensão líder amino-terminal das espécies principais de anticorpo.

5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pela extensão líder amino-terminal compreender VHS-.

6. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pela extensão líder amino-terminal consistir em VHS-.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada por compreender uma variante de sequência de aminoácidos das espécies principais de anticorpo HER2 selecionada a partir do grupo que consiste em um anticorpo que compreende um resíduo de lisina C-terminal em uma ou ambas cadeias pesadas do mesmo, e um anticorpo com um ou mais

resíduos oxidados de metionina.

8. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender a composição conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em um veículo farmacêuticamente aceitável.

9. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por ser estéril.

10. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizado por compreender:

(1) preparar uma composição que compreende uma espécie principal de anticorpo HER2 que se liga ao domínio II do HER2 e compreende sequências de aminoácidos de cadeia leve e cadeia pesada nas SEQ ID Nos. 15 e 16, respectivamente, e variantes ácidas da espécie principal do anticorpo HER2, incluindo variante glicada, variante dissulfeto reduzida e variante não reduzível, em que a espécie principal de anticorpo HER2 é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição, e a espécie principal de anticorpo HER2 e as variantes ácidas são todos anticorpos intactos; e

(2) avaliar as variantes ácidas na composição, e confirmar que a quantidade das mesmas é menor do que 25%.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela etapa (2) compreender avaliar as variantes ácidas por um método selecionado a partir do grupo que consiste em cromatografia de troca iônica, em que a composição é tratada com sialidase, eletroforese capilar reduzida com dodecil sulfato de sódio (CE-SDS), CE-SDS não reduzido, cromatografia boronato e mapeamento de peptídeo.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela etapa (2) compreender avaliar as variantes ácidas por cromatografia de troca iônica.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado

por compreender cromatografia de troca de cátion com o uso de um trocador catiônico com um grupo funcional carboxilato.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelas condições para a cromatografia envolverem: Tampão A de 20 mM BisTris, pH 6,0; Tampão B de 20 mM BisTris, 200 mM NaCl, pH 6,0; e um gradiente de 0,5% Tampão B a 1,0mL/min.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por compreender a combinação da composição após a etapa (2) com um veículo farmaceuticamente aceitável.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela composição avaliada na etapa (2) estar em um veículo farmaceuticamente aceitável.

17. USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 8 ou 9, caracterizado por ser para a produção de um medicamento para o tratamento de um câncer positivo para HER2.

18. USO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo câncer ser selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão e câncer colorretal.

19. USO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela espécie principal de anticorpo HER2 e variantes ácidas possuírem, essencialmente, a mesma farmacocinética.

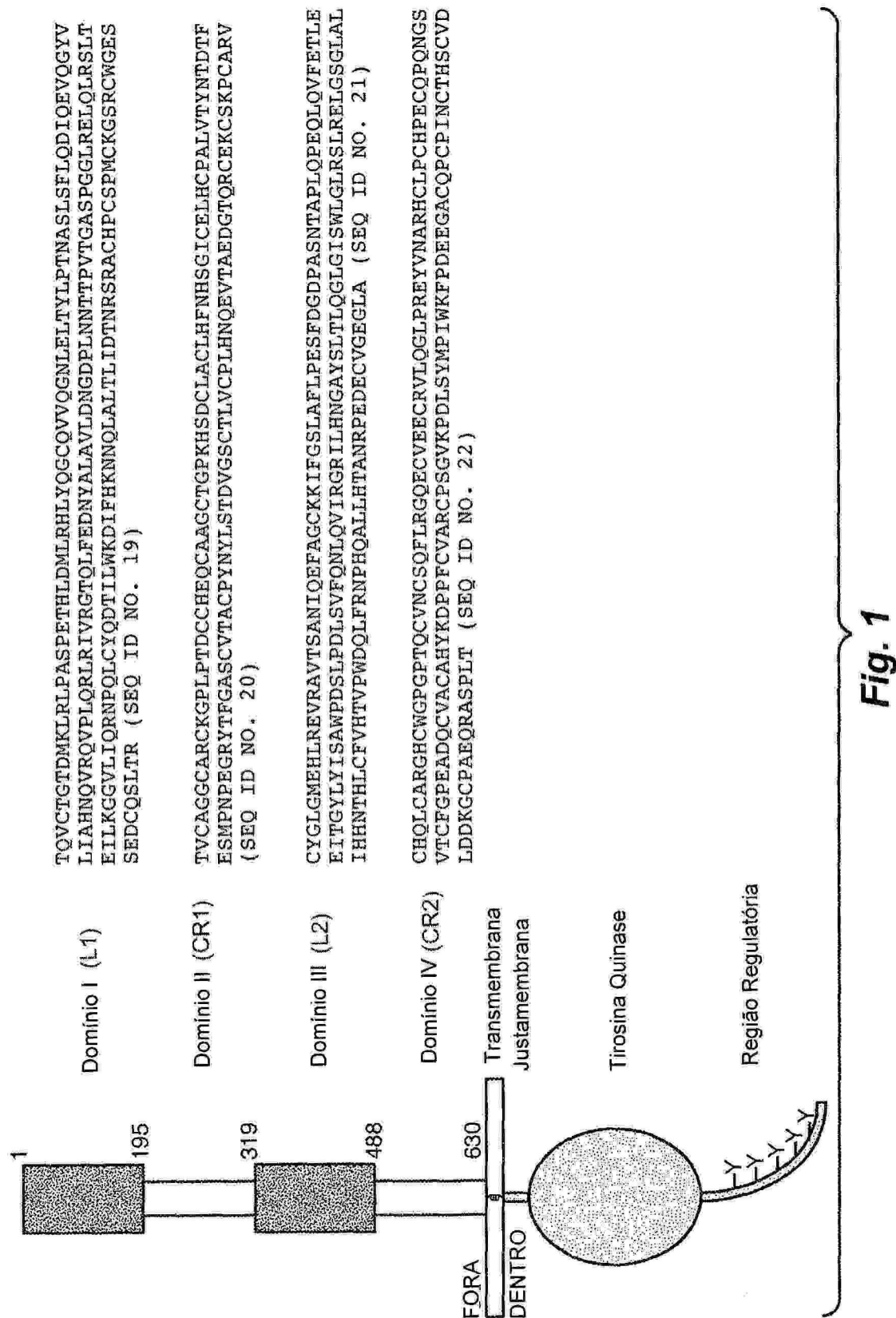


Fig. 1

Variável Leve

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQR	P
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQSI SNYLA]	WYQQK	P

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

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)	
	* *	*	*
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)	
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QQYNLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)	

Fig. 2A**Variável Pesada**

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** *	*****	*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVD	RSSRIVYM	
	* * **	*** *	***** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** *** *****	* * *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN	SKNTLYL	

	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)		
	*** **		**		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)		

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)		

Fig. 2B

Sequência de Aminoácidos para Cadeia Leve de Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 | | | | | | | | | | |
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAWYQOKPGKAPKLLIYSASRYTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 | | | | | | | | | |
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 | | | | | | | | | |
 SDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 | | | | | |
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 3A

Sequência de Aminoácidos para Cadeia Pesada de Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 | | | | | | | | | |
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
 70 80 90 100 110 120
 | | | | | | | | | |
 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 | | | | | | | | | |
 STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 | | | | | | | | | |
 LYSLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 | | | | | | | | | |
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 | | | | | | | | | |
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 | | | | | | | | | |
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 | | | | |
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

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 R F S G 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 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

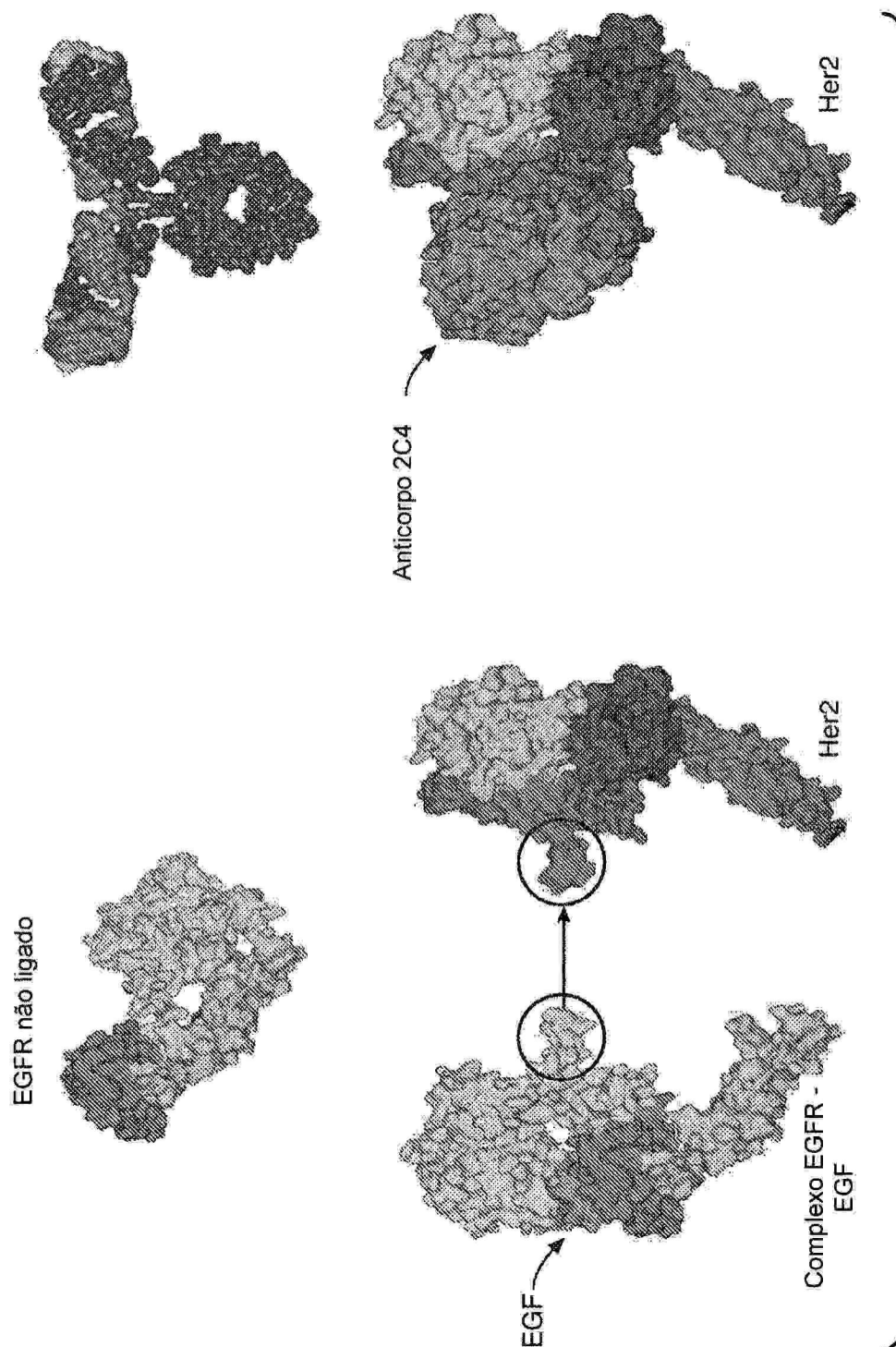
```

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 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 se liga ao sítio de ligação heterodimérica



Acoplamento de HER2/3 por vias MAPK e Akt

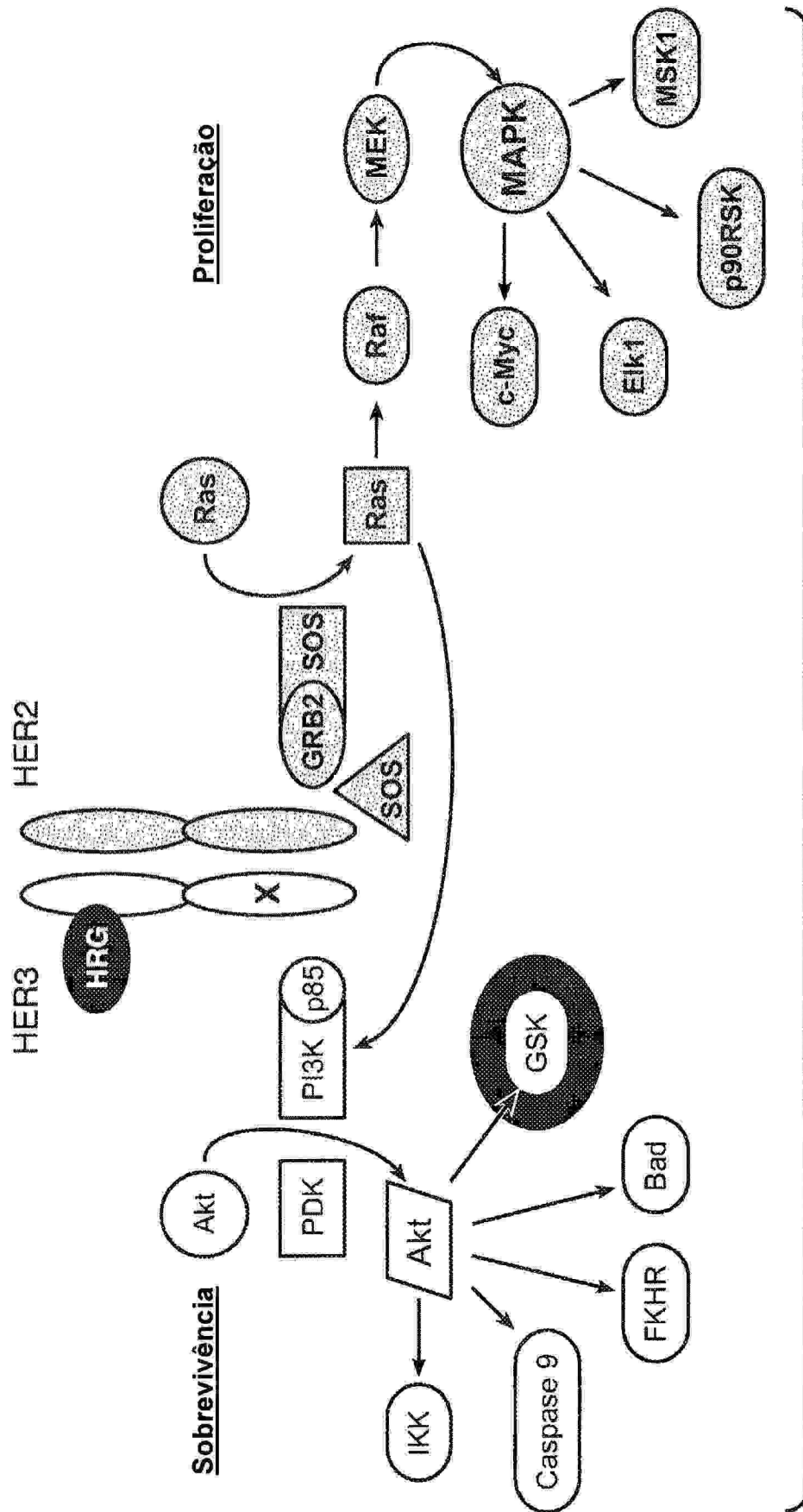


Fig. 6

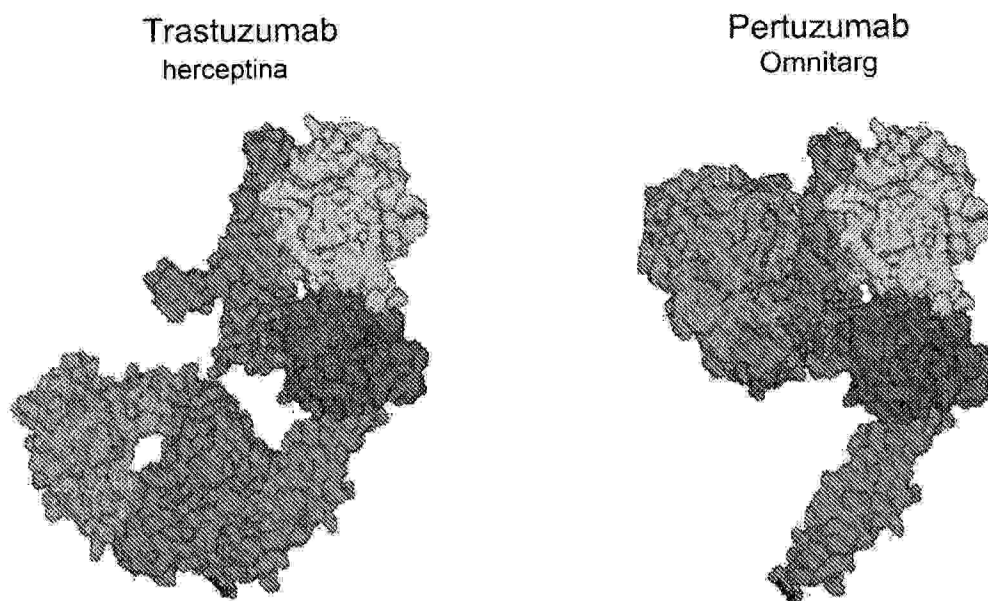


Fig. 7

Cadeia Pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWVQRQAPGKGL 45
 30
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
 75
 91 TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS 135
 120
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLQSS 180
 165
 181 GLYSLSLVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKKVDKKVEPKSCDK 225
 210
 226 THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS 270
 255
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY³⁰⁰NSTYRVVSVLTVLHQD 315
 300
 316 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPRREPQVYTLPPSREE 360
 345
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPVLDSDG 405
 390
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS⁴³⁵CSVMHEALHNH⁴⁴⁹YTQKSLSLSPG 449

Fig. 8B

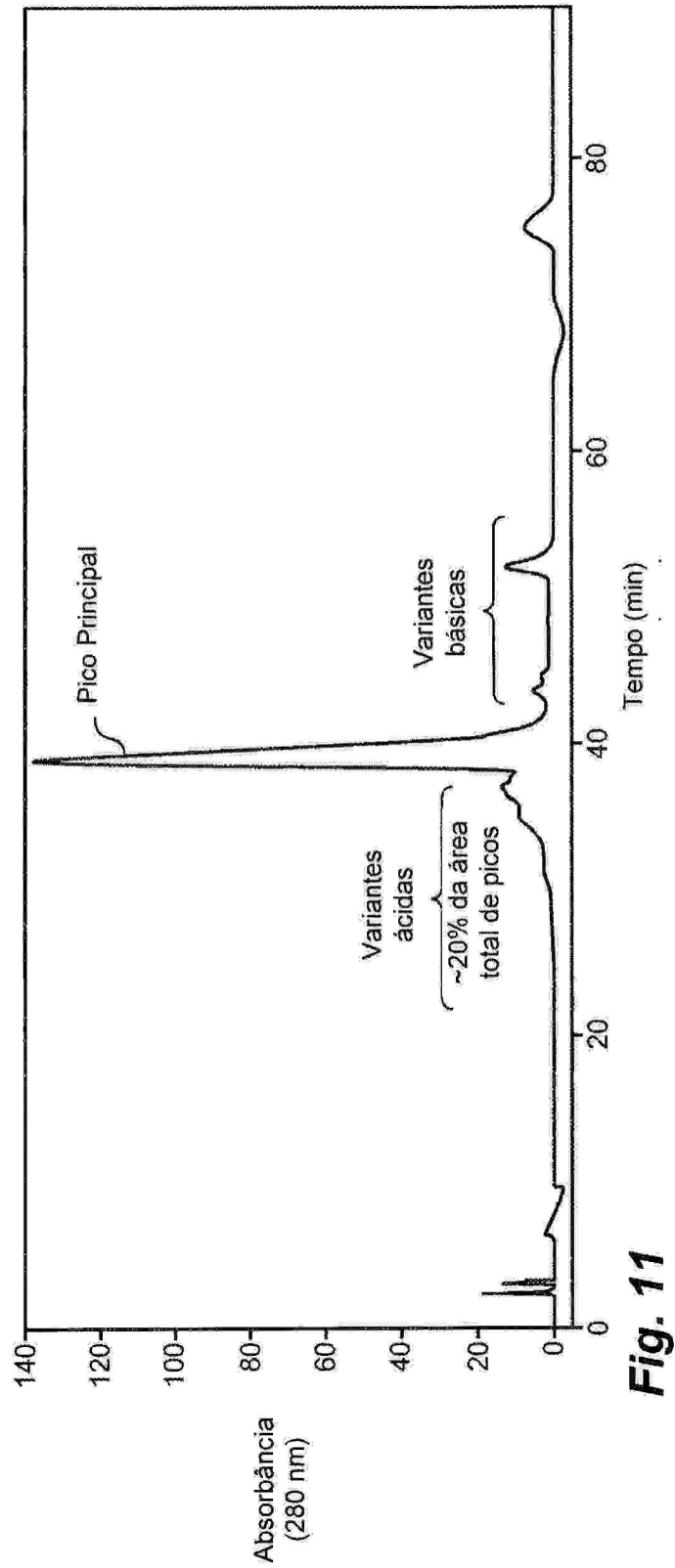
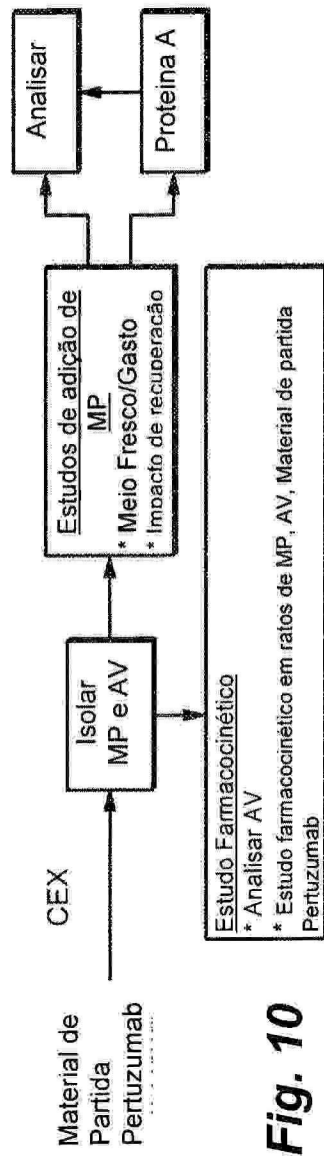
1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
136 V C L L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

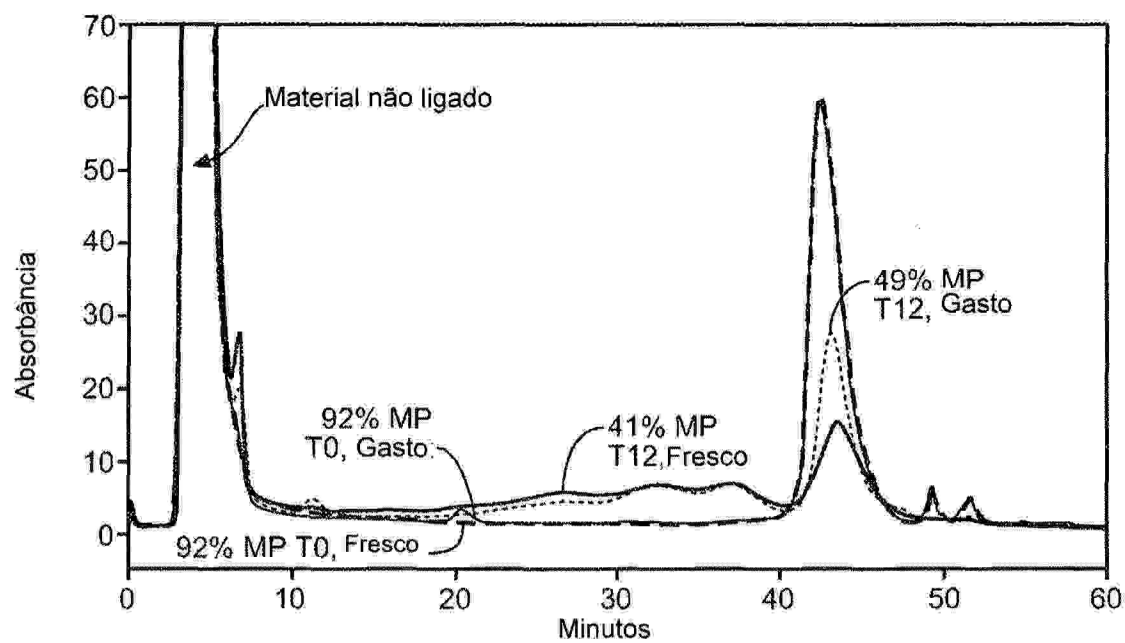
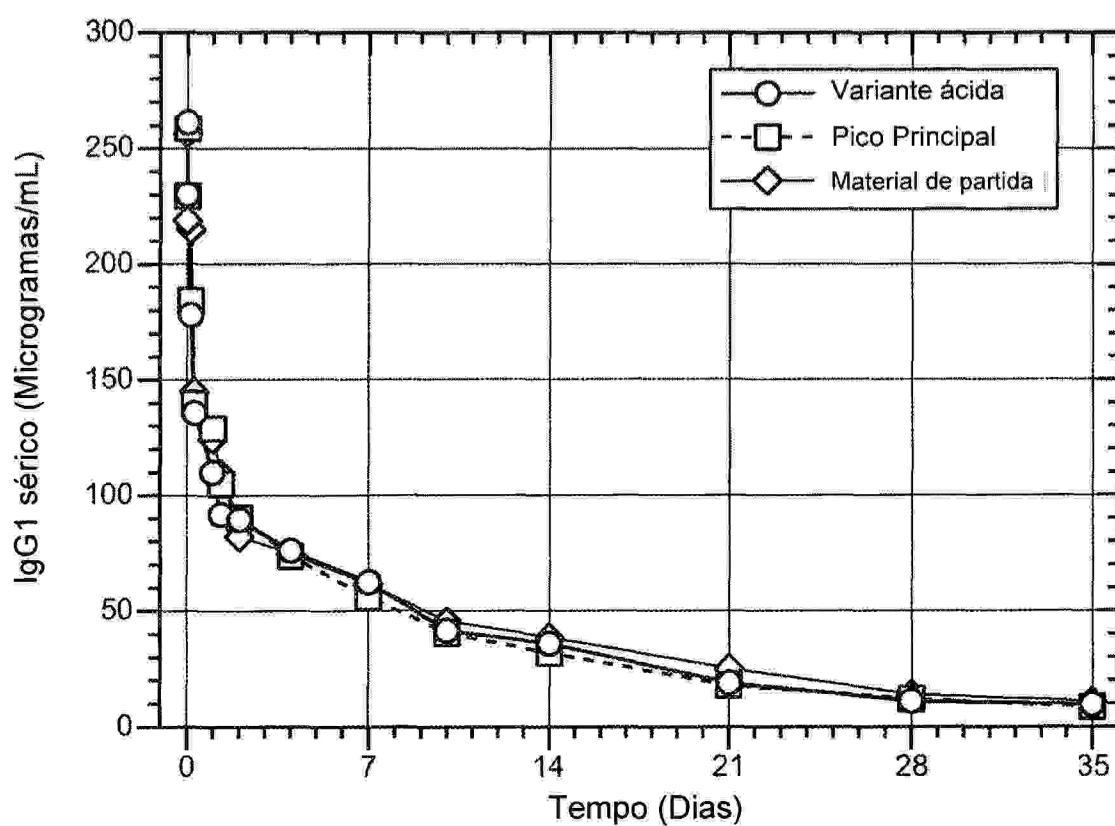
Fig. 9A

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDDWVRQAPGKGL 45
 46 EWVADVNPNSSGGSIYNQRRFKGRFTLSVDRSSKNTLYLQMNSSLRAED 90
 91 TAVYYCARNLLGPSSFYFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSSVFFPLAPSSK 135
 136 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAAVLQSSG 180
 181 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKKVDKKVEPKSCDKT 225
 226 HTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH 270
 271 EDPEVKFNWYVDGVGVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW 315
 316 LNKGEYKKCVSNKALPAPIEEKTISKAKGQPRPEPQVYTLPPSREEM 360
 361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS 405
 406 FFLYSKLTVDKSRWQQGQGVNVPFSSCVMHHAALHNHYTQKSSLSPGK 449

(SEQ ID NO. 24)

Fig. 9B



**Fig. 13****Fig. 16**