



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

(11) BR 112014012539-2 B1



(22) Data do Depósito: 20/11/2012

(45) Data de Concessão: 20/12/2022

(54) Título: ANTICORPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A HER3, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO, E USOS DO ANTICORPO

(51) Int.Cl.: C07K 16/40.

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2012 US 61/722,558; 07/06/2012 US 61/656,670; 23/11/2011 US 61/563,092.

(73) Titular(es): MEDIMMUNE, LLC.

(72) Inventor(es): PARTHA S. CHOWDHURY; DAVID TICE; ZHAN XIAO; PHILIPP STEINER; KRISTA KINNEER; MARLON REBELATTO.

(86) Pedido PCT: PCT US2012066038 de 20/11/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/078191 de 30/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/05/2014

(57) Resumo: MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA HER3 E USOS DESSAS. Trata-se de anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno desses que ligam o domínio extracelular do receptor HER3 e inibem várias funções relacionadas ao receptor HER3 através de mecanismos dependentes de ligante e/ou independentes de ligante. Também proporcionam-se composições com meia-vida aumentada. Ademais, a invenção fornece composições e métodos para diagnosticar e tratar doenças associadas à transdução de sinal mediada por HER3.

“ANTICORPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A HER3, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO, E USOS DO ANTICORPO”.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA ELETRONICAMENTE ENVIADA

[0001] Este pedido incorpora a título de referência uma Listagem de Sequência enviada com esse pedido como o arquivo de texto intitulado “Her3-100WO1_SL” criado em 12 de novembro de 2012 e com um tamanho de 31,3 kilobytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção fornece composições que se ligam especificamente a HER3 e métodos para uso dessas composições para o tratamento de câncer.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[0003] O receptor de fator de crescimento epidérmico humano 3 (HER3, também conhecido como Erbb3) é um receptor de proteína tirosina e pertence à subfamília de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) EGFR/HER de receptor de proteína tirosina quinases (RTK), que consiste em EGFR (HER1/Erbb1), HER2/Erbb2, HER3/Erbb3 e HER4/Erbb4. EGFR e HER2 estão entre as RTKs oncogênicas mais bem estabelecidas ativando a tumorigênese de múltiplos tipos de tumores sólidos, inclusive categorias maiores como cânceres de mama, colorretal, e pulmão. As atividades de tirosina quinase de EGFR e HER2 foram consideradas essenciais para suas atividades oncogênicas.

[0004] Como o EGFR prototípico, o receptor de transmembrana HER3 consiste em um domínio de ligação ao ligante extracelular (ECD), um domínio de dimerização dentro do ECD, um domínio de transmembrana, e domínio de proteína tirosina quinase intracelular (TKD) e um domínio de fosforilação C-terminal (veja, por exemplo, Kim

et al. (1998), Biochem. J. 334, 189-195; Roepstorff *et al.* (2008) Histochem. Cell Biol. 129, 563-578).

[0005] O ligante Heregulina (HRG) se liga ao domínio extracelular de HER3 e ativa a via de sinalização mediada por receptor ao promover a dimerização com outros membros da família EGFR (*por exemplo*, outros receptores HER) e transfosforilação de seu domínio intracelular. Foi revelado que HER3 é desprovido de atividade de tirosina quinase detectável, provavelmente devido a uma substituição não conservativa de alguns resíduos essenciais no domínio tirosina quinase. Portanto, uma consequência dessa deficiência de quinase, HER3 precisa formar heterodímeros com outras RTKs, especialmente EGFR e HER2, para serem submetidos à fosforilação e serem funcionalmente ativos.

[0006] A principal função de HER3 em oncogênese é atuar como uma proteína de arcabouço para permitir a máxima indução da via PI3K/AKT. Foi revelado que HER3 contém um grupo de seis motivos contendo tirosina C-terminal que quando fosforilados imitam o sítio de ligação consenso PI3K/p85. Então, ao formar heterodímeros com HER3, os onco-drivers a montante, EGFR, HER2, cMET e FGFR2, podem se acoplar mais eficientemente à via PI3K/AKT. Portanto, é razoável esperar que uma perda de atividade de HER3 possa bloquear a progressão de câncer em diversos sistemas ativados por RTKs divergentes. Estudos mostraram que HER3 siRNA se choca com as células de câncer de mama amplificadas por HER2 resultando em efeitos anti-proliferativos similares como nocaute de HER2 siRNA, demonstrando ainda a necessidade crítica de câncer de HER3.

[0007] Além de promover o crescimento tumoral em condições não acentuadas, HER3 foi considerado como altamente envolvido na atribuição de resistências terapêuticas a muitos fármacos almejados, inclusive inibidores de tirosina quinase EGFR, anticorpos monoclonais HER2 como trastuzumab, bem como inibidores de pequenas moléculas

de PI3K ou AKT ou MEK. Isso adiciona outra camada de atração a HER3 como um alvo de câncer promissor para redução de volume tumoral primário bem como combate a questões de resistência de câncer que surgem invariavelmente apesar de respostas clínicas iniciais.

[0008] HER3 possui duas maneiras diferentes de dimerização com suas RTKs parceiras: dependente de ligante (na presença de HRG) ou independente de ligante. Em termos de dímeros HER2-HER3, é conhecido que em células com expressão de HER2 baixa a média, HER3 pode apenas ser complexado com HER2 após a ligação ao ligante; em contrapartida, em células com HER2 amplificado (HER2 IHC 3+), esses formam dímeros espontâneos sem HRG (Junttila *et al.* (2009) *Cancer Cell.* 15(5):429-40). Os dímeros formados na presença ou ausência do ligante são estruturalmente diferentes como foi demonstrado por um estudo anterior que mostra que trastuzumab/Herceptin® (anticorpo monoclonal HER2 Genentech/Roche aprovado para cânceres de mama HER2 3+) pode interromper apenas o dímero independente de ligante, porém não o dímero dependente de ligante, enquanto pertuzumab/Omnitarg® (rhuMAb 2C4, anticorpo monoclonal HER2 Genentech/Roche em ensaios de fase 3) pode interromper apenas os dímeros dependentes de ligante.

[0009] A formação de dímero entre os elementos da família HER expande o potencial de sinalização de HER3 e é um meio não só para a diversificação de sinal como também para a amplificação de sinal. HER3 foi revelado como fosforilado em uma variedade de contextos celulares. Por exemplo, HER3 é constitutivamente fosforilado em resíduos de tirosina em um subconjunto de células de câncer de mama humanas que superexpressam HER3 (veja, *por exemplo*, Kraus *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2900-2904; Kim *et al.* (1998), *Biochem. J.* 334, 189-195; Schaefer *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64, 3395-

3405; Schaefer *et al.* (2006) *Neoplasia* 8, 612-622). Consequentemente, as terapias que interferem efetivamente na fosforilação de HER3 são desejadas.

[0010] Ademais, HER3 foi considerado como superexpresso e/ou superativado em vários tipos de cânceres como câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de fígado, cânceres de rim e da bexiga urinária, cânceres pancreáticos, cânceres de cérebro, neoplasmas hematopoiéticos, retinoblastomas, melanomas, cânceres colorretais, cânceres gástricos, cânceres de cabeça e pescoço, câncer de pulmão, etc. (veja, *por exemplo*, Sithanandam & Anderson (2008) *Cancer Gene Ther.* 15, 413-448). Em geral, HER3 é frequentemente ativado em cânceres que expressam EGFR, HER2, C-Met, e FGFRII.

[0011] Uma correlação entre a expressão de HER2/HER3 e a progressão de um estágio não invasivo para um estágio invasivo foi mostrada (Alimandi *et al.*, *Oncogene* 10, 1813-1821; DeFazio *et al.*, *Cancer* 87, 487-498; Naidu *et al.*, *Br. J. Cancer* 78, 1385-1390). Assim, HER3 pode ser usado como um marcador diagnóstico para agressividade de tumor aumentada e sobrevida insatisfatória. A ativação de HER3 sustentada de PI3K/AKT foi repetitivamente mostrada para explicar a resistência de tumor a inibidores EGFR/HER2.

[0012] Embora a função de HER3 no desenvolvimento e progressão de câncer seja explorada (veja, *por exemplo*, Horst *et al.* (2005) *Int. J. Cancer* 115, 519-527; Xue *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426), HER3 permanece amplamente não avaliado como um alvo para a intervenção clínica. As imunoterapias mais atuais se concentram principalmente na inibição da ação de HER2 e, em particular, heterodimerização de complexos HER2/HER3 (veja, *por exemplo*, Sliwkowski *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14661-14665). Assim, um objetivo da presente invenção é fornecer agentes imunoterapêuticos aprimorados que inibem efetivamente a sinalização de célula mediada

por HER3 que pode ser usada para o diagnóstico, previsão de prognóstico, e tratamento de uma variedade de cânceres.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0013] A descrição fornece moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, *por exemplo*, anticorpos monoclonais capazes de suprimir a atividade de HER3 em cenários dependentes e independentes de ligantes. Em contrapartida, outros anticorpos monoclonais anti-HER3 na técnica (*por exemplo*, Ab #6 (Publicação de Patente Internacional WO 2008/100624) e U1-59 (Publicação de Patente Internacional WO 2007077028; também referida aqui como AMG)), podem suprimir apenas a atividade de HER3 dependente de ligantes. Também são descritas moléculas de ligação a anti-HER3 maturadas por afinidade com potência aumentada e meia-vida prolongada, que consequentemente podem ser administradas menos frequentemente, em um intervalo aumentado entre as doses, e em volumes de dose menores. A descrição também fornece métodos de tratamento de doenças como câncer em um indivíduo humano que compreende a administração de uma molécula de ligação anti-HER3. Em alguns aspectos específicos, um anticorpo humano mutante YTE derivado de 2C2 é usado.

[0014] A descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a um epítopo dentro do domínio extracelular de HER3, em que a molécula de ligação se liga especificamente ao mesmo epítopo HER3 que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse que compreende a região variável de cadeia pesada (VH) e a região variável de cadeia leve (VL) de CL16 ou 2C2. Também proporciona-se uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3, e inibe competitivamente a ligação a HER3 por um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse que

compreende a VH e VL de CL16 ou 2C2.

[0015] A descrição também fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno desse que se liga especificamente a HER3 que comprehende um anticorpo VL, em que a VL comprehende a sequência de aminoácido:

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

em que [FW₁], [FW₂], [FW₃] e [FW₄] representam as regiões de estrutura VL, e em que

- (a) X₁ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R) ou Serina (S),
- (b) X₂ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Leucina (L),
- (c) X₃ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Glicina (G),
- (d) X₄ representa os resíduos de aminoácido Leucina (L) ou Prolina (P),
- (e) X₅ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) ou Serina (S), e
- (f) X₆ representa os resíduos de aminoácido Valina (V) ou Alanina (A).

[0016] Ademais, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que comprehende um anticorpo VH, em que a VH comprehende a sequência de aminoácido:

[FW₅]YYYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]

em que [FW₅], [FW₆], [FW₇] e [FW₈] representam as regiões de estrutura VH, e em que X₇ representa os resíduos de aminoácido Tirosina (Y), Isoleucina (I) ou Valina (V).

[0017] A descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL e um anticorpo VH, em que a VL compreende a sequência de aminoácido:

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃
X₄X₅GEX₆[FW₄]

em que [FW₁], [FW₂], [FW₃] e [FW₄] representam regiões de estrutura VL, e em que

(a) X₁ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R) ou Serina (S),

(b) X₂ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Leucina (L),

(c) X₃ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Glicina (G),

(d) X₄ representa os resíduos de aminoácido Leucina (L) ou Prolina (P),

(e) X₅ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) ou Serina (S), e

(f) X₆ representa os resíduos de aminoácido Valina (V) ou Alanina (A), e

em que a VH compreende a sequência de aminoácido:

[FW₅]YYYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGD
AFDI[FW₈]

em que [FW₅], [FW₆],[FW₇] e [FW₈] representam as regiões de estrutura VH, e em que X₇ representa os resíduos de aminoácido Tirosina (Y), Isoleucina (I) ou Valina (V).

[0018] A descrição também fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL, em que a VL compreende uma sequência de aminoácido de região-1

determinante de complementaridade VL (VL-CDR1) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas ou uma substituição de aminoácido à: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, ou SEQ ID NO: 20. Também, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL, em que a VL compreende uma sequência de aminoácido de região-2 determinante de complementaridade VL (VL-CDR2) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas ou uma substituição de aminoácido à SEQ ID NO: 21.

[0019] Ademais, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL, e a VL compreende uma sequência de aminoácido de região-3 determinante de complementaridade (VL-CDR3) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido à: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, ou SEQ ID NO: 30. Também, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VH, em que a VH compreende uma sequência de aminoácido de região-1 determinante de complementaridade (VH-CDR1) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido à SEQ ID NO: 31.

[0020] Ademais, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VH, em que a VH compreende uma sequência de aminoácido de região-2 determinante de complementaridade (VH-CDR2) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido à: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, ou SEQ ID NO: 34. Também

proporciona-se uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VH, em que a VH compreende uma sequência de aminoácido de região-3 determinante de complementaridade (VH-CDR3) idêntica, ou idêntica exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido à SEQ ID NO: 35.

[0021] A descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL, em que a VL compreende sequências de aminoácido VL-CDR1, VL-CDR2, e VL-CDR3 idênticas, ou idênticas exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido em uma ou mais entre VL-CDRS às: SEQ ID NOs: 18, 21 e 22, SEQ ID NOs: 18, 21, e 26, SEQ ID NOs: 18, 21, e 27 , SEQ ID NOs: 20, 21, e 22, SEQ ID NOs: 19, 21, e 22, SEQ ID NOs: 18, 21, e 25, SEQ ID NOs: 18, 21, e 28, SEQ ID NOs: 18, 21, e 29, SEQ ID NOs: 18, 21, e 30, SEQ ID NOs: 18, 21, e 23, SEQ ID NOs: 19, 21, e 23, SEQ ID NOs: 20, 21, e 23, SEQ ID NOs: 18, 21, e 24, ou SEQ ID NOs: 18, 21, e 25, respectivamente. A descrição também fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VH, em que a VH compreende sequências de aminoácido VH-CDR1, VH-CDR2, e VH-CDR3 idênticas, ou idênticas exceto por quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido em uma ou mais entre VH-CDRS às: SEQ ID NOs: 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 31, 33, e 35, ou SEQ ID NOs: 31, 34, e 35, respectivamente.

[0022] Ademais, a descrição fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno desse que se liga especificamente a HER3 que compreende uma VL e uma VH que compreende sequências de aminoácido VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, e VH-CDR3 idênticas ou idênticas exceto por quatro, três, duas, ou uma

substituição de aminoácido em uma ou mais CDRs às: SEQ ID NOs: 18, 21, 22, 31, 32, e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 26, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 27, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 19, 21, 22, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 28, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 29, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 30, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 20, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 31, 32 e 35, ou SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 31, 32 e 35, respectivamente. Também proporciona-se uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL e um anticorpo VH, em que a VL compreende uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 90% a cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, e SEQ ID NO: 17. A descrição também fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a HER3 que compreende um anticorpo VL e um anticorpo VH, em que a VH compreende uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 90% a cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13. Ademais, a descrição fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno desse que se liga especificamente a HER3, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende uma VL que compreende uma sequência pelo menos cerca de 90% a cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, e SEQ ID NO: 17, e em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende uma VH que compreende uma sequência pelo menos cerca de 90% a cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

[0023] A descrição também fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno desse, que compreende uma VL que compreende SEQ ID NO: 49 e uma VH que compreende SEQ ID NO: 50. Ademais, a descrição fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno desse, que compreende uma VL que compreende SEQ ID NO: 3 e uma VH que compreende SEQ ID NO: 2. Ademais, a descrição fornece uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a um epítopo dentro do domínio extracelular de HER3, que compreende um anticorpo VL de SEQ ID NO:3, um anticorpo VH de SEQ ID NO: 2, e uma região constante IgG1 de SEQ ID 46. Também proporciona-se uma molécula de ligação isolada ou fragmento de ligação ao antígeno dessa que se liga especificamente a um epítopo dentro do domínio extracelular de HER3, que consiste em um anticorpo VL de SEQ ID NO: 3, um anticorpo VH de SEQ ID NO: 2, e uma região constante IgG1 de SEQ ID 46.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[0024] A **Figura 1** mostra a internalização de anticorpos monoclonais anti-HER3 Clone 16 em células KPL4 mostradas como uma depleção de coloração fluorescente de superfície. O painel superior mostra a internalização em tempo = 0. Os painéis inferiores mostram a internalização após 2,5 horas.

[0025] A **Figura 2A** mostra um alinhamento múltiplo de sequência

correspondente às sequências VL de anticorpos monoclonais anti-HER3 Clone 16 (CL16; original, clone original), Clone 16 (GL; clone de linha genética), 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6 e 4C4. A localização de CDR1, CDR2, e CDR3 é indicada. Os resíduos de aminoácido que se diferem em relação ao anticorpo CL16 (GL) estão sublinhados.

[0026] A **Figura 2B** mostra um alinhamento múltiplo de sequência correspondente às sequências VH de anticorpos monoclonais anti-HER3 Clone 16 (CL16; clone original), e clones 15D12.1 (também referidos como 15D12.I) e 15D12.2 (também referidos como 15D12.V). As localizações de CDR1, CDR2, e CDR3 são indicadas. Os resíduos de aminoácido que se diferem em relação ao anticorpo original CL16 estão sublinhados.

[0027] A **Figura 2C** mostra um alinhamento múltiplo de sequência correspondente às sequências VL de anticorpos monoclonais anti-HER3 CL16 (original, clone original), CL16 (GL; clone de linha genética), 1A4, 2C2, 3E.1, 2F10, e 2B11. A localização de CDR1, CDR2, e CDR3 é indicada. Os resíduos de aminoácido que se diferem em relação ao anticorpo CL16 (GL) estão sublinhados.

[0028] A **Figura 3** mostra a supressão de fosforilação de HER3 (pHER3) em células MCF-7 ativadas por ligante, onde HER3 é ativado somente por HRG exógeno (ligante). O monoclonal anti-HER32C2, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, e anticorpo de controle R347 foram analisados. As porcentagens máximas de inibição de pHER3 e IC₅₀'s são apresentadas.

[0029] A **Figura 4** mostra a supressão de crescimento em células MDA-MB-175, um modelo ativado por alça autócrina HRG estabelecida em que HRG endógeno ativa a atividade de HER3 e o crescimento celular. O monoclonal anti-HER3 2C2, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, e anticorpo de controle R347 foram

analisados. As porcentagens máximas de inibição de crescimento e IC₅₀'s são apresentadas.

[0030] A **Figura 5** mostra a supressão de crescimento em células HMCB, um modelo ativado por alça autócrina HRG estabelecida em que HRG endógeno ativa a atividade de HER3 e o crescimento celular. O monoclonal anti-HER3 2C2, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, e anticorpo de controle R347 forma analisados. IC₅₀'s são apresentadas.

[0031] A **Figura 6** mostra que 2C2 não só inibiu o crescimento celular HMCB como também suprimiu a fosforilação de HER3 (pHER3) e a fosforilação de AKT (pAKT) nesse melanoma dependente de ligante.

[0032] A **Figura 7** mostra que 2C2 suprimiu a fosforilação de HER3 (pHER3) e a fosforilação de AKT (pAKT) em A549 NSCLC dependente de ligante.

[0033] A **Figura 8** mostra a supressão de fosforilação de HER3 (pHER3) em modelos celulares para câncer Gástrico Pulmonar e de Mama. O **Painel A** mostra a supressão de pHER3 na linhagem celular HCC827, um modelo NSCLC ativado por EGFR mutante com linha cruzada de EGFR/HER3. O **Painel B** mostra a supressão de pHER3 em um modelo HCC827 NSCLC resistente a EGFR-TKI obtido através de tratamento de longo prazo com EGFR TKI. O **Painel C** mostra a supressão de pHER3 na linhagem celular MKN45, um modelo de câncer gástrico amplificado por cMET com linha cruzada de cMET-HER3. O **Painel D** mostra a supressão de pHER3 na linhagem celular Kato III, um modelo de câncer gástrico amplificado por FGFR2 com linha cruzada de FGFR2-HER3. O **Painel E** mostra a supressão de pHER3 na linhagem celular BT-474, um modelo independente de ligante de câncer de mama amplificado por HER2 (*isto é*, células desprovidas de expressão de HRG). O monoclonal anti-HER3 2C2, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, e anticorpo de controle

R347 foram analisados. As porcentagens máximas de inibição de pHER3 e IC₅₀'s são apresentadas.

[0034] A **Figura 9** mostra a supressão de fosforilação de AKT (pAKT) em modelos celulares para câncer gástrico e de mama. O **Painel A** mostra a supressão de pAKT na linhagem celular MKN45. O **Painel B** mostra a supressão de pAKT na linhagem celular Kato III. O **Painel C** mostra a supressão de pAKT na linhagem celular BT-474, um modelo independente de ligante de câncer de mama amplificado por HER2 - (*isto é*, células desprovidas de expressão de HRG). O monoclonal anti-HER3 2C2, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, e anticorpo de controle R347 foram analisados. As porcentagens máximas de inibição de pAKT e IC₅₀'s são apresentadas.

[0035] A **Figura 10** mostra que 2C2 suprime a sinalização e proliferação celular em células MDA-MB-361. O **Painel A** mostra que 2C2 suprimiu a fosforilação de HER3 (pHER3) em células MDA-MB-361 amplificadas por HER2. O **Painel B** mostra que 2C2 suprimiu o crescimento celular de maneira dose-dependente. A porcentagem de inibição é mostrada para tratamentos de 6 e 14 dias (painéis superiores e inferiores, respectivamente).

[0036] A **Figura 11** mostra que 2C2 suprimiu a fosforilação de HER3 (pHER3) em células HARA-B que expressam altos níveis de HRG.

[0037] A **Figura 12** mostra que 2C2 e rhuMab 2C4, porém não os antagonistas EGFR cetuximab ou gefitinib, inibem a sinalização dependente de ligante de HRG (parte inferior de **Painéis A e B**). A porção superior dos **Painéis A e B** são células basais, SW620 (**Painel A**, esquerdo), SW480 (**Painel A**, intermediário), Colo205 (**Painel A**, direito), LOVO (**Painel B**, esquerdo), HCT15 (**Painel B**, intermediário) e Caco-2 (**Painel B**, direito).

[0038] A **Figura 13** mostra um ensaio de ligação ELISA HRG-HER3 que mede o bloqueio direto de ligação de HRG a HER3 pelo Clone 16,

anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados, um anticorpo monoclonal anti-HER3 de bloqueio de ligante de controle positivo, e o anticorpo de controle R347.

[0039] A **Figura 14** mostra que 2C2 bloqueia a dimerização de HER2-HER3. O **Painel A** mostra um ensaio de dimerização de HER2-HER3 induzível por HRG que avalia a extensão de formação de complexo HER2-HER3 em células T-47D, um modelo dependente de ligante que mostra uma associação evidente de HER2-HER3 induzido por HRG, pré-tratado com 2C2, CL16, anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM. Todos os anticorpos anti-HER3 bloquearam essa dimerização de HER2-HER3 induzida por ligante. O **Painel B** mostra um ensaio de dimerização de HER2-HER3 independente de ligante que avalia a extensão de formação de complexo HER2-HER3 em células BT-474, pré-tratado com 2C2 ou CL16 bloqueou essa dimerização de HER2-HER3 independente de ligante.

[0040] A **Figura 15** mostra a internalização e degradação de HER3 induzidas por 2C2. O **Painel A** mostra um ensaio de internalização baseado em FACS que quantifica o curso de tempo e extensão de internalização alvo em resposta a duas concentrações de anticorpo monoclonal 2C2 diferentes. O **Painel B** mostra a degradação de HER3 em modelo de células de câncer colorretal Lovo, HCT15, e SW620 pré-tratado com anticorpo monoclonal anti-HER3 2C2, ou o anticorpo de controle R347.

[0041] A **Figura 16** mostra uma análise de ciclo celular baseada em FACS que demonstra que em células SkBR3, uma linhagem celular de câncer de mama amplificada por HER2 similar a BT-474, tanto Herceptin® (trastuzumab) como o anticorpo monoclonal CL16 (derivação original para o anticorpo monoclonal 2C2) causaram a interrupção de ciclo celular na fase G1. Os resultados correspondentes a células tratadas com o anticorpo de controle R347 e com o anticorpo

monoclonal anti-HER2 rhuMAb 2C4 (pertuzumab/ Omnitarg®) também são mostrados.

[0042] A **Figura 17** mostra a inibição de HRG induzida por secreção de VEGF por anticorpos anti-HER3. O **Painel A** mostra alterações em secreção de VEGF em células de câncer de mama BT-474 pré-tratadas com anticorpos monoclonais anti-HER3 CL16 e Merrimack MM, anticorpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® (trastuzumab), ou o anticorpo de controle R347. O **Painel B** mostra alterações em secreção de VEGF em modelo de células de câncer de mama MCF-7 pré-tratadas com anticorpos monoclonais anti-HER3 CL16 e Merrimack MM, anticorpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® (trastuzumab), ou o anticorpo de controle R347.

[0043] A **Figura 18** mostra que o anticorpo monoclonal anti-HER3 2C2 se liga a cino baseado em superfície celular HER3 ectopicamente expresso em células Ad293 e modula sua atividade. O **Painel A** mostra uma análise de Western blot de células Ad293 transfectadas com um vetor de controle (lado esquerdo) ou um vetor que expressa cino HER3 (lado direito). As células foram tratadas com 2C2 ou um anticorpo de controle (R347) com ou sem co-estimulação com HRG e sondadas com anticorpos anti-HER3 (mancha intermediária), anti-pHER3 (mancha superior), e anti-GAPDH (mancha inferior). O **Painel B** representa a quantificação baseada em densitometria de pHER3 nas quatro faixas superiores do Painel A.

[0044] A **Figura 19** mostra uma redução dose-dependente em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto de cabeça e pescoço FADU humano. O **Painel A** mostra que 7 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 99% de dTGI (inibição de crescimento tumoral) nesse modelo. O **Painel B** mostra uma forte redução no volume tumoral após a administração combinada

do anticorpo monoclonal 2C2 com o anticorpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que utiliza o modelo de xenoenxerto de cabeça e pescoço FADU humano. O tratamento de combinação produziu 7 entre 10 regressões parciais e 2/10 de regressões completas.

[0045] A **Figura 20** mostra a farmacocinética não linear de 2C2 após a administração de dose única e dose repetida de 5 mg/kg ou 30 mg/kg em camundongos portadores de tumor. Os dados sugerem que o HER3 de camundongo serve como um depósito para ligar 2C2 administrado nos camundongos e que 30 mg/kg como uma dose única é suficiente para saturar o depósito.

[0046] A **Figura 21** mostra o benefício antitumoral de uma dose de carga de 10 mg/kg do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto de cabeça e pescoço FADU humano. A administração de uma dose de carga de 2C2 para saturar o depósito de HER3 de camundongo permitiu que 2C2 em 3 mg/kg demonstre uma forte atividade antitumoral enquanto 3 mg/kg de 2C2 sem uma dose de carga possui apenas uma atividade moderada.

[0047] A **Figura 22** mostra que o tratamento com 2C2-YTE reduz os níveis de pHER3 e pAKT em extratos de tumor de xenoenxerto FADU. Nesse experimento, os níveis de pHER3 e pAKT foram reduzidos por 59,5% e 51,7%, respectivamente. Nenhuma alteração foi observada em níveis de HER3 totais nesse experimento.

[0048] A **Figura 23** mostra uma redução dose-dependente em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto de cabeça e pescoço Detroit562 humano. O **Painel A** mostra que 10 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 72% de dTGI. O **Painel B** mostra uma redução em volume de tumor após a administração combinada do anticorpo monoclonal 2C2 com o anticorpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que utiliza o modelo de xenoenxerto

de cabeça e pescoço Detroit562 humano. O tratamento de combinação produziu 9 entre 10 regressões parciais enquanto cetuximab individualmente produziu 5/10 de regressões parciais. O modelo de xenoenxerto Detroit562 contém uma mutação PIK3CA.

[0049] **Figura 24** mostra uma redução dose dependente em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2-YTE utilizando o modelo de xenoenxerto de cabeça e pescoço CAL27 humano.

[0050] A **Figura 25** mostra uma redução dose-dependente em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto A549 NSCLC humano. O **Painel A** mostra que 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 91% de dTGI até o último dia da fase de tratamento (dia 33; crescimento renovado subsequentemente). 2C2-YTE e 2C2 em 10 mg/kg possuem atividade comparável. O **Painel B** mostra uma redução em volume de tumor após a administração combinada do anticorpo monoclonal 2C2 com o anticorpo monoclonal anti-EGFR cetuximab utilizando o modelo de xenoenxerto A549 NSCLC humano. A adição de cetuximab a 2C2 aumentou a atividade de 2C2 durante a fase de tratamento e retardou o crescimento renovado durante a fase de crescimento renovado de tumor. O modelo de xenoenxerto A549 contém uma mutação de KRAS e uma deleção de LKB-1.

[0051] A **Figura 26** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2-YTE utilizando o modelo de xenoenxerto de carcinoma de célula escamosa HARA-B humano. 30 mg/kg de 2C2-YTE administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 64,6% de dTGI. 2C2-YTE em 10 mg/kg possui atividade comparável enquanto 2C2-YTE em 3 mg/kg não está ativo.

[0052] A **Figura 27** mostra uma redução dose-dependente em

volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto colorretal HT-29 humano. 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 56% dTGI até o último dia da fase de tratamento (dia 26; crescimento renovado subsequentemente). 2C2-YTE e 2C2 em 30 mg/kg possuem atividade comparável. O modelo de xenoenxerto HT-29 contém uma mutação BRAF.

[0053] A **Figura 28** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do 2C2 anticorpo monoclonal utilizando o modelo de xenoenxerto colorretal HCT-116 humano. 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 43% de dTGI. 2C2-YTE e 2C2 em 10 mg/kg possuem atividade comparável. O modelo de xenoenxerto HCT-116 contém uma mutação de KRAS.

[0054] A **Figura 29** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto colorretal LOVO humano. 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 48% de dTGI. 2C2-YTE e 2C2 em 10 mg/kg possuem atividade comparável. O modelo de xenoenxerto LOVO contém uma mutação de KRAS.

[0055] A **Figura 30** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto de próstata DU145 humano. 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 77% de dTGI. O modelo de xenoenxerto DU145 contém uma deleção de LKB-1.

[0056] A **Figura 31** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama BT-474 humano. O **Painel A** mostra 30 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram

maximamente eficazes em 55% de dTGI. O **Painel B** mostra uma redução em volume de tumor após a administração combinada do anticorpo monoclonal 2C2 com o fármaco de pequena molécula lapatinib utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama BT-474 humano. A adição de 2C2 a lapatinib aumentou a atividade de lapatinib durante a fase de tratamento e retardou modestamente o crescimento renovado de tumor durante a fase de crescimento renovado de tumor. 2C2-YTE e 2C2 em 30 mg/kg possuem atividade comparável durante a fase de tratamento como tratamentos de monoeficácia. O **Painel C** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama BT-474 humano. Trastuzumab individualmente foi muito ativo nesse modelo e pouco aumentou foi observado pela adição de 2C2 nesse modelo. O modelo de xenoenxerto BT-474 contém HER2 amplificado (3+ por HercepTest).

[0057] A **Figura 32** mostra que o tratamento com o Clone 16 (precursor 2C2) reduz os níveis de pHER3 e pAKT em extratos de tumor de xenoenxerto BT-474. Nesse experimento, os níveis de pHER3 e pAKT foram reduzidos em 50% e 46,1%, respectivamente. Nenhuma alteração foi observado nos níveis de HER3 totais nesse experimento.

[0058] A **Figura 33** mostra uma redução em volume de tumor após a administração do anticorpo monoclonal 2C2 utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama MCF-7 humano. O **Painel A** mostra que 10 mg/kg de 2C2 administrados duas vezes por semana foram maximamente eficazes em 34% de dTGI. 2C2-YTE e 2C2 em 10 mg/kg possuem atividade comparável. O **Painel B** mostra uma redução em volume de tumor após a administração combinada do anticorpo monoclonal 2C2 com o fármaco de pequena molécula paclitaxel utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama MCF-7 humano. A adição de 2C2 a paclitaxel aumentou a atividade de

paclitaxel durante a fase de tratamento. O modelo de xenoenxerto MCF-7 contém baixos níveis de HER2 (1+ por HercepTest).

[0059] A **Figura 34** mostra uma redução em volume de tumor após a administração de 2C2-YTE utilizando o modelo de xenoenxerto ortotópico de câncer de mama MDA-MB-361 humano (**Painéis A-C**). A adição de 2C2-YTE ao anticorpo monoclonal trastuzumab aumentou a atividade de trastuzumab durante a fase de tratamento e retardou o crescimento renovado de tumor durante a fase de crescimento renovado de tumor (**Painel A**). A adição de 2C2-YTE ao anticorpo monoclonal rhuMAb 2C4 aumentou modestamente a atividade de rhuMAb 2C4, porém não retardou o crescimento renovado dos tumores (**Painel B**). A adição de 2C2-YTE ao fármaco de pequena molécula lapatinib aumentou a atividade de lapatinib, porém não retardou o crescimento renovado dos tumores (**Painel C**).

[0060] A **Figura 35** mostra níveis de exposição prolongados do anticorpo monoclonal 2C2-YTE em soro de camundongos transgênicos FcRh SCID humanos naïve comparados com 2C2 e Clone 16-GL após uma única dose desses anticorpos em 60 mg/kg.

[0061] A **Figura 36** mostra que os níveis de proteína HER3 aumentam em resposta ao tratamento com o inibidor MEK (MEKi) selumetinib (indicado por uma estrela). O tratamento com o MEKi em combinação com 2C2 reduz os níveis de HER3 novamente para o normal em modelos de câncer de células HT-29 (esquerda), LOVO (meio) e Colo205 (direito). Os níveis de pHER3 também foram examinados nos modelos HT-29 e LOVO e revelaram resposta similarmente.

[0062] A **Figura 37** mostra que a combinação de 2C2-YTE e selumetinib aumenta a eficácia antitumoral do agente individualmente em modelos de xenoenxerto de câncer subcutâneo e A549 (**Painel A**, superior), HT-29 (**Painel B**, superior), LOVO (**Painel C**, superior). A

análise de Western blot de lisados de tumor (modelos de xenoenxerto A549, HT-29 e LOVO) de camundongos tratados com a combinação mostrou que phospho-HER3 e phospho-ERK foram completamente inibidos (Painéis A-C, inferiores).

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0063] A presente invenção fornece moléculas e fragmentos de ligação ao antígeno dessas que se ligam a HER3. Em alguns aspectos, essas moléculas são anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno desses que se ligam especificamente a HER3. Polinucleotídeos relacionados, composições que compreendem os anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, e métodos de fabricação dos anticorpos anti-HER3 e fragmentos de ligação ao antígeno também são fornecidos. Os métodos de uso dos novos anticorpos anti-HER3, como métodos de tratamento de câncer em um indivíduo e usos diagnósticos, são adicionalmente fornecidos.

[0064] Para que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, alguns termos são primeiramente definidos. As definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

I. Definições

[0065] Antes de descrever a presente invenção em detalhes, será entendido que essa invenção não é limitada a composições ou etapas de processo específicos, visto que essas podem variar. Como usado nesse relatório descritivo e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um", "uma" e "o" incluem referentes no plural exceto onde o contexto indicar claramente em contrário. Os termos "um" (ou "uma"), bem como os termos "um ou mais", e "pelo menos um" podem ser usados de maneira intercambiável aqui.

[0066] Ademais, "e/ou" onde usado aqui deve ser considerado como uma descrição específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o outro. Assim, o termo

"e/ou" como usado em uma frase como "A e/ou B" aqui pretende incluir "A e B", "A ou B", "A" (individualmente), e "B" (individualmente). Também, o termo "e/ou" como usado em uma frase como "A, B, e/ou C" pretende incluir cada um dos seguintes aspectos: A, B, e C; A, B, ou C; A ou C; A ou B; B ou C; A e C; A e B; B e C; A (individualmente); B (individualmente); e C (individualmente).

[0067] Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados aqui possuem o mesmo significado como comumente entendido por um elemento versado na técnica ao qual essa descrição está relacionada. Por exemplo, Concise Dictionary of Biomedicine e Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell e Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; e Oxford Dictionary Of Biochemistry E Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, fornecem uma habilidade com um dicionário geral de muitos dos termos usados nessa invenção.

[0068] Unidades, prefixos, e símbolos são denotados em sua forma aceita de Système International de Unites (SI). As faixas numéricas são inclusivas dos números que definem a faixa. Exceto onde indicado em contrário, as sequências de aminoácido são escritas da esquerda para a direita em orientação amino para carbóxi. Os títulos fornecidos aqui não são limitações dos vários aspectos, esses podem ser lidos a título de referência ao relatório descritivo como um todo. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente definidos a título de referência ao relatório descritivo em sua totalidade.

[0069] Entende-se que sempre que os aspectos forem descritos aqui com a linguagem "compreendendo", aspectos de outro modo análogos descritos em termos de "consistindo em" e/ou "consistindo essencialmente em" também são fornecidos.

[0070] Os aminoácidos referidos aqui por seus símbolos de três

letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Os nucleotídeos também são referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos

[0071] Os termos "HER3" e "receptor HER3" são usados de maneira intercambiável aqui, e se referem à proteína ErbB3 (também referidos como HER3, receptor ErbB3 na literatura) como descrito na Patente No. U.S. 5.480.968 e em Plowman *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4905-4909; veja também, Kani *et al.* (2005) Biochemistry 44, 15842-15857, e Cho & Leahy (2002) Science 297, 1330-1333. A sequência proteica HER3 madura de comprimento total (sem sequência líder) corresponde à sequência mostrada na Figura 4 e SEQ ID NO: 4 da Patente No. U.S. 5.480.968 menos a sequência líder de 19 aminoácidos que é clivada da proteína madura.

[0072] Os termos "inibição" e "supressão" são usados de maneira intercambiável aqui e se referem a qualquer redução estatisticamente significativa em atividade biológica, inclusive o bloqueio total da atividade. Por exemplo, "inibição" pode se referir a uma redução de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% em atividade biológica. Consequentemente, quando os termos "inibição" ou "supressão" forem aplicados para descrever, *por exemplo*, um efeito sobre a fosforilação de HER3 mediada por ligante, o termo se refere à capacidade de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse reduzir de maneira estatisticamente significativa a fosforilação de HER3 induzida por um ligante tipo EGF, em relação à fosforilação em uma célula não tratada (controle). A célula que expressa HER3 pode ser uma célula ou linhagem celular de ocorrência natural (*por exemplo*, uma célula cancerosa) ou pode ser recombinantemente produzida ao introduzir um ácido nucleico que codifica HER3 em uma célula hospedeira. Em um aspecto, a molécula de ligação anti-HER3,

por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse inibe a fosforilação mediada por ligante de HER3 em pelo menos 10%, ou pelo menos 20%, ou pelo menos 30%, ou pelo menos 40%, ou pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 905, ou cerca de 100%, como determinado, por exemplo, por Western blotting seguido por sondagem com um anticorpo anti-fosfotirosina ou por ELISA, como descrito nos Exemplos infra.

[0073] O termo "supressão de crescimento" de uma célula que expressa HER3, como usado aqui, se refere à capacidade de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse reduzir de maneira estatisticamente significativa a proliferação de uma célula que expressa HER3 em relação à proliferação na ausência da molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse. Em um aspecto, a proliferação de uma célula que expressa HER3 (*por exemplo*, uma célula cancerosa) pode ser reduzida por pelo menos 10%, ou pelo menos 20%, ou pelo menos 30%, ou pelo menos 40%, ou pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou cerca de 100% quando as células entrarem em contato com uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse da presente invenção, em relação à proliferação medida na ausência da molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse (condições de controle). A proliferação celular pode ser avaliada utilizando técnicas reconhecidas com a taxa de medida de divisão celular, a fração de células dentro de uma população celular que é submetida à divisão celular, e/ou taxa de perda celular de uma população celular devido à diferenciação terminal ou morte celular (*por exemplo*, incorporação de timidina).

[0074] Os termos "anticorpo" ou "imunoglobulina", como usados de maneira intercambiável aqui, incluem anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação ao antígeno ou cadeias simples desses.

[0075] Um anticorpo típico compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2, e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR), combinadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FW). Cada VH e VL é compreendida de três CDRs e quatro FWs, dispostas a partir de amino-terminal para carboxi-terminal na seguinte ordem: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos hospedeiros ou fatores, inclusive várias células do sistema imune (*por exemplo*, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico. Os anticorpos exemplificativos da presente descrição incluem os anticorpos anti-HER3 Clone 16 (CL16) (originais e de linha genética), clones otimizados por afinidade que incluem, por exemplo, o anticorpo anti-HER3 2C2, e anticorpos anti-HER3 otimizados por meia-vida no soro inclusive, por exemplo, o anti-HER3 2C2-YTE anticorpo.

[0076] O termo "linha genética" significa que os aminoácidos em

posições específicas em um anticorpo são modificados novamente para aquela linha genética. *Por exemplo*, o anticorpo CL16 "de linha genética" é gerado a partir do anticorpo CL16 original ao introduzir três mutações pontuais, Y2S, E3V e M20I, em FW1 das regiões VL.

[0077] O termo "anticorpo" significa uma molécula de imunoglobulina que reconhece e se liga especificamente a um alvo, como uma proteína, polipeptídeo, peptídeo, carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, ou combinações do anterior através de pelo menos um sítio de reconhecimento antigênico dentro da região variável da molécula de imunoglobulina. Como usado aqui, o termo "anticorpo" inclui anticorpos policlonais intactos, anticorpos monoclonais intactos, fragmentos de anticorpo (como fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, e Fv), mutantes Fv de cadeia simples (scFv), anticorpos multiespecíficos como anticorpos biespecíficos gerados de pelo menos dois anticorpos intactos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de determinação de antígeno de um anticorpo, e qualquer outra molécula de imunoglobulina modificada que compreende um sítio de reconhecimento antigênico desde que os anticorpos exibam a atividade biológica desejada. Um anticorpo pode ser de qualquer uma das cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, ou subclasses (isotipos) dessas (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), com base na identidade de seus domínios constantes de cadeia pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gama, e mu, respectivamente. As classes diferentes de imunoglobulinas possuem estruturas de subunidade diferentes e bem conhecidas e configurações tridimensionais. Os anticorpos podem ser nus ou conjugados com outras moléculas como toxinas, radioisótopos, etc.

[0078] Um anticorpo de "bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é um que inibe ou reduz a atividade biológica do antígeno que se liga,

como HER3. Em um determinado aspecto, os anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem substancial ou completamente a atividade biológica do antígeno. Desejavelmente, a atividade biológica é reduzida em 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou ainda 100%.

[0079] O termo "anticorpo HER3" ou "um anticorpo que se liga a HER3" ou "anti-HER3" se refere a um anticorpo que é capaz de ligar HER3 com afinidade suficiente de modo que o anticorpo seja útil como um agente terapêutico ou reagente diagnóstico em HER3 de marcação. A extensão de ligação de um anticorpo anti-HER3 a uma proteína não HER3 não relacionada é menor que cerca de 10% da ligação do anticorpo a HER3 como medido, *por exemplo*, por um radioimunoensaio (RIA), BIACORE™ (utilizando HER3 recombinante como o analito e anticorpo como o ligante, ou *vice-versa*), ou outros ensaios de ligação conhecidos na técnica. Em alguns aspectos, um anticorpo que se liga a HER3 possui uma constante de dissociação (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ pM}$, $\leq 1 \text{ pM}$, ou $\leq 0.1 \text{ pM}$.

[0080] O termo "fragmento de ligação ao antígeno" se refere a uma porção de um anticorpo intacto e se refere às regiões variáveis determinantes antigênicas de um anticorpo intacto. É conhecido na técnica que a função de ligação antigênica de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, porém sem caráter limitativo fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, e Fv, anticorpos lineares, anticorpos de cadeia simples, e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

[0081] Um "anticorpo monoclonal" se refere a uma população de anticorpo homogêneo envolvida no reconhecimento altamente específico e ligação de um único determinante antigênico, ou epítopo. Isso se contrapõe aos anticorpos policlonais que incluem tipicamente

anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes antigênicos diferentes. O termo "anticorpo monoclonal" inclui anticorpos monoclonais intactos e de comprimento total bem como fragmentos de anticorpo (como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), mutantes de cadeia simples (scFv), proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra molécula de imunoglobulina modificada que compreende um sítio de reconhecimento antigênico. Ademais, "anticorpo monoclonal" se refere a esses anticorpos feitos de inúmeras maneiras que incluem, porém sem se limitarem a, por hibridoma, seleção de fago, expressão recombinante, e animais transgênicos.

[0082] O termo "anticorpo humanizado" se refere a um anticorpo derivado de uma imunoglobulina não humana (*por exemplo*, murídeas), que foi elaborado geneticamente para conter sequências não humanas mínimas (*por exemplo*, murídeas). Tipicamente, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas em que os resíduos da região determinante de complementaridade (CDR) são substituídos por resíduos da CDR de uma espécie não humana (*por exemplo*, camundongo, rato, coelho, ou hamster) que possuem a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). Em alguns casos, os resíduos de região de estrutura Fv (FW) de uma imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos correspondentes em um anticorpo de uma espécie não humana que possui a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas.

[0083] O anticorpo humanizado pode ser adicionalmente modificado pela substituição de resíduos adicionais na região de estrutura Fv e/ou dentro dos resíduos não humanos substituídos para refinar e otimizar a especificidade, afinidade, e/ou capacidade de anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender

substancialmente todos entre pelo menos um, e tipicamente dois ou três domínios variáveis contendo todas ou substancialmente todas as regiões CDR que correspondem à imunoglobulina não humana enquanto todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região ou domínio constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente que de uma imunoglobulina humana. Exemplos de métodos usados para gerar anticorpos humanizados são descritos na Patente Nos. U.S. 5.225.539 ou 5.639.641.

[0084] Uma "região variável" de um anticorpo se refere à região variável do anticorpo cadeia leve ou a região variável da cadeia pesada de anticorpo, individualmente ou em combinação. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve consistem em quatro regiões de estrutura (FW) conectadas por três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) também conhecidas como regiões hipervariáveis. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas regiões FW e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação antigênico de anticorpos. Há pelo menos duas técnicas para determinar CDRs: (1) uma abordagem baseada em variabilidade de sequência interespécies (*isto é*, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); e (2) uma abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos antígeno-anticorpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Ademais, as combinações dessas duas abordagens às vezes são usadas na técnica para determinar CDRs.

[0085] O sistema de numeração de Kabat é geralmente usado quando se refere a um resíduo no domínio variável (aproximadamente resíduos 1-107 da cadeia leve e resíduos 1-113 da cadeia pesada) (por

exemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0086] A numeração de posição de aminoácido como em Kabat, se refere ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando-se esse sistema de numeração, a sequência de aminoácido linear real pode conter menos aminoácidos ou adicionais correspondentes a um encurtamento, ou inserção, de uma FW ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir uma única inserção de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (*por exemplo*, resíduos 82a, 82b, e 82c, *etc.* de acordo com Kabat) após o resíduo 82 de cadeia pesada FW.

TABELA 1

Loop	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34 (Numeração de Kabat)
H1	H31-H35	H31-H35	H26-H32 (Numeração de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0087] A numeração de Kabat de resíduos pode ser determinada

para um determinado anticorpo por alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat "padrão". Chothia se refere em vez da localização das alças estruturais (Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). O final da alça Chothia CDR-H1 quando numerado utilizando a convenção de numeração de Kabat varia entre H32 e H34 dependendo do comprimento da alça (isso porque o esquema de numeração de Kabat posiciona as inserções em H35A e H35B; se nem 35A nem 35B estiverem presentes, a alça termina em 32; se apenas 35A estiver presente, a alça termina em 33; se 35A e 35B estiverem presentes, a alça termina em 34). As AbM regiões hipervariáveis representam um compromisso entre as CDRs de Kabat e alças estruturais Chothia, e são usadas por software de modelagem de anticorpo Oxford Molecular's AbM.

[0088] IMGT (ImMunoGeneTics) também fornece um sistema de numeração para as regiões variáveis de imunoglobulina, inclusive as CDRs. Veja, *por exemplo*, Lefranc, M.P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003), que está aqui incorporado a título de referência. O sistema de numeração IMGT está baseado em um alinhamento de mais de 5.000 sequências, dados estruturais, e caracterização de alças hipervariáveis e permite uma fácil comparação das regiões variáveis e CDR com todas as espécies. De acordo com o esquema de numeração de IMGT VH-CDR1 está nas posições 26 a 35, VH-CDR2 está nas posições 51 a 57, VH-CDR3 está nas posições 93 a 102, VL-CDR1 está nas posições 27 a 32, VL-CDR2 está nas posições 50 a 52, e VL-CDR3 está nas posições 89 a 97.

[0089] Como usado ao longo do relatório descritivo, as sequências CDRs VH descritas correspondem às localizações de numeração de Kabat clássicas, isto é, Kabat VH-CDR1 está nas posições 31-35, VH-CDR2 está nas posições 50-65, e VH-CDR3 está nas posições 95-102. VL-CDR2 e VL-CDR3 também correspondem às localizações de

numeração de Kabat clássicas, isto é, posições 50-56 e 89-97, respectivamente. Como usado aqui, os termos "VL-CDR1" ou "cadeia leve CDR1" correspondem às sequências localizadas nas posições de Kabat 23-34 na VL (em contrapartida, a localização VL-CDR1 clássica de acordo com o esquema de numeração de Kabat corresponde às posições 24-34).

[0090] Como usado aqui, a região Fc inclui os polipeptídeos que compreendem a região constante de um anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante. Assim, Fc se refere aos últimos dois domínios de imunoglobulina de região constante de IgA, IgD, e IgG, e os últimos três domínios de imunoglobulina de região constante de IgE e IgM, e a dobradiça flexível N-terminal a esses domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende os domínios de imunoglobulina Cgamma2 e Cgamma3 (Cy2 e Cy3) e a dobradiça entre Cgamma1 (Cy1) e Cgamma2 (Cy2). Embora os limites da região Fc possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humano é geralmente definida para compreender resíduos C226 ou P230 para esse carbóxi-terminal, em que a numeração está de acordo com o índice EU como apresentado em Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Fc pode se referir a essa região em isolamento, ou essa região no contexto de um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou proteína de fusão Fc. Polimorfismos foram observados em inúmeras posições Fc diferentes, inclusive, mas sem limitarem a, posições 270, 272, 312, 315, 356, e 358 como numerado pelo índice EU, e, assim, pode haver ligeiras diferenças entre a sequência apresentada e as sequências na técnica anterior.

[0091] O termo "anticorpo humano" significa um anticorpo produzido por um humano ou um anticorpo que possui uma sequência

de aminoácido correspondente a um anticorpo produzido por um humano feito utilizando qualquer técnica conhecida. Essa definição de um anticorpo humano inclui anticorpos intactos ou de comprimento total, fragmentos desses, e/ou anticorpos que compreendem pelo menos um polipeptídeo humano de cadeia pesada e/ou leve como, por exemplo, um anticorpo que compreende polipeptídeos murídeos de cadeia leve e polipeptídeos humanos de cadeia pesada polipeptídeos.

[0092] O termo "anticorpos quiméricos" se refere a anticorpos em que a sequência de aminoácido da molécula de imunoglobulina é derivada de duas ou mais espécies. Tipicamente, a região variável de cadeias leves e pesadas corresponde à região variável de anticorpos derivados de uma espécie de mamíferos (*por exemplo*, camundongo, rato, coelho, etc) com a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas enquanto as regiões constantes são homólogas às sequências em anticorpos derivados de outras (geralmente humanos) para evitar obter uma resposta imune nessa espécie.

[0093] Os termos "YTE" e "mutante YTE" se referem a uma mutação em IgG1 Fc que resulta em um aumento na ligação a FcRn humano e aumenta a meia-vida no soro do anticorpo que possui a mutação. Um mutante YTE compreende uma combinação de três mutações, M252Y/S254T/T256E (EU numbering Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introduzidas na cadeia pesada de um IgG1. Veja, a Patente No. U.S. 7.658.921, que está aqui incorporada a título de referência. O mutante YTE se revelou aumentar a meia-vida no soro de anticorpos aproximadamente quatro vezes como comparado com versões do tipo selvagem do mesmo anticorpo (Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). Veja também a Patente No. U.S. 7.083.784, que está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0094] "Afinidade de ligação" geralmente se refere à intensidade da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (*por exemplo*, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (*por exemplo*, um antígeno). Exceto onde indicado em contrário, como usado aqui, "afinidade de ligação" se refere à afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação 1:1 entre elementos de um par de ligação (*por exemplo*, anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X com seu parceiro Y pode ser geralmente representada pela constante de dissociação (K_D). A afinidade pode ser medida por métodos comuns na técnica, inclusive aqueles descritos aqui. Os anticorpos de baixa afinidade geralmente ligam o antígeno lentamente e tendem a se dissociar rapidamente, enquanto anticorpos de alta afinidade geralmente ligam o antígeno mais rápido e tendem a permanecer ligados mais tempo. Uma variedade de métodos para medir a afinidade de ligação é conhecida na técnica, qualquer um desses pode ser usado para os propósitos da presente invenção.

[0095] "Potência" é normalmente expressa como um valor IC_{50} , em nM exceto onde estabelecido em contrário. IC_{50} é a concentração inibitória mediana de uma molécula de anticorpo. Em ensaios funcionais, IC_{50} é a concentração que reduz uma resposta biológica em 50% de seu máximo. Em estudos de ligação de ligante, IC_{50} é a concentração que reduz a ligação de receptor em 50% de nível de ligação específico máximo. IC_{50} pode ser calculada por qualquer número de meios conhecidos na técnica. Um aumento na potência pode ser determinado ao medir, *por exemplo*, contra o anticorpo monoclonal CL16 original (Clone 16).

[0096] O aumento na potência dos anticorpos ou polipeptídeos da invenção como comparado com um anticorpo Clone 16 pode ser pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de

10 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 30 vezes, pelo menos cerca de 40 vezes, pelo menos cerca de 50 vezes, pelo menos cerca de 60 vezes, pelo menos cerca de 70 vezes, pelo menos cerca de 80 vezes, pelo menos cerca de 90 vezes, pelo menos cerca de 100 vezes, pelo menos cerca de 110 vezes, pelo menos cerca de 120 vezes, pelo menos cerca de 130 vezes, pelo menos cerca de 140 vezes, pelo menos cerca de 150 vezes, pelo menos cerca de 160 vezes, pelo menos cerca de 170 vezes, ou pelo menos cerca de 180 vezes ou mais.

[0097] "Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" ou "ADCC" se refere a uma forma de citotoxicidade em que a Ig secretada ligada a receptores Fc (FcRs) presente em algumas células citotóxicas (por exemplo, células Assassinas Naturais (NK), neutrófilos, e macrófagos) permite que essas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo contendo antígeno e subsequentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos IgG de alta afinidade específicos dirigidos para a superfície de células alvo "armam" as células citotóxicas e são absolutamente exigidos para esse extermínio. A lise da célula alvo é extracelular, exige contato direto célula-célula, e não envolve complemento. É contemplado que, além de anticorpos, outras proteínas que compreendem as regiões Fc, especificamente proteínas de fusão Fc, que possuem a capacidade de se ligarem especificamente a uma célula alvo contendo antígeno serão capazes de realizar a citotoxicidade mediada por célula. Para simplicidade, a citotoxicidade mediada por célula que resulta da atividade de uma proteína de fusão Fc também é referida aqui como atividade ADCC.

[0098] Um polipeptídeo, anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula, ou composição que é "isolada" é um polipeptídeo, anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula, ou composição que está em uma forma não encontrada na natureza. Os polipeptídeos isolados, anticorpos,

polinucleotídeos, vetores, células ou composições incluem aqueles que foram purificados a um grau que não estejam mais sob a forma em que esses forem encontrados na natureza. Em alguns aspectos, um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula, ou composição que é isolada é substancialmente pura.

[0099] O termo "indivíduo" se refere a qualquer animal (*por exemplo*, um mamífero), que inclui, porém sem caráter limitativo, humanos, primatas não humanos, roedores, e similares, que deve ser o receptor de um tratamento particular. Tipicamente, os termos "indivíduo" e "paciente" são usados de maneira intercambiável em referência a um indivíduo humano.

[0100] O termo "composição farmacêutica" se refere a uma preparação que está sob tal forma para permitir que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz, e que não contém componentes adicionais que são inaceitavelmente tóxicos a um indivíduo no qual a composição poderia ser administrada. Essa composição pode ser estéril.

[0101] Uma "quantidade eficaz" de um anticorpo como descrito aqui é uma quantidade suficiente para realizar um propósito especificamente determinado. Uma "quantidade eficaz" pode ser determinada empiricamente e de maneira rotineira, em relação ao propósito determinado.

[0102] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de um anticorpo ou outro fármaco eficaz para "tratar" uma doença ou distúrbio em um indivíduo ou mamífero.

[0103] A palavra "marcador" quando usada aqui se refere a um composto ou composição detectável que é direta ou indiretamente conjugado ao anticorpo para gerar um anticorpo "marcado". O marcador pode ser detectável por si mesmo (*por exemplo*, marcadores radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um

marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável.

[0104] Os termos como "tratando" ou "tratamento" ou "tratar" ou "aliviando" ou "aliviar" se referem a (1) medidas terapêuticas que curam, retardam, reduzem os sintomas, e /ou param a progressão de uma condição ou distúrbio patológico diagnosticado e (2) medidas profiláticas ou preventivas que previnem e/ou retardam o desenvolvimento de uma condição ou distúrbio patológico almejado. Assim, aqueles necessitados de tratamento incluem aqueles que já apresentam o distúrbio; aqueles propensos a terem o distúrbio; e aqueles em que o distúrbio será prevenido. Em alguns aspectos, um indivíduo é corretamente "tratado" para câncer de acordo com os métodos da presente invenção se o paciente mostrar, *por exemplo*, remissão total, parcial, ou temporária de um determinado tipo de câncer.

[0105] Os termos "câncer", "tumor", "canceroso", e "maligno" se referem ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cânceres incluem, porém sem se limitarem a, carcinoma inclusive adenocarcinomas, linfomas, blastomas, melanomas, sarcomas, e leucemias. Exemplos mais particulares desses cânceres incluem câncer de célula escamosa, câncer pulmonar de pequenas células, câncer pulmonar de células não pequenas, câncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, câncer pancreático, glioblastoma, glioma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado como carcinoma hepático e hepatoma, câncer de bexiga, câncer de mama (inclusive câncer de mama hormonalmente mediado, veja, *por exemplo*, Innes *et al.* (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065), câncer de colón, câncer colorretal, carcinoma endometrial, mieloma (como mieloma múltiplo), carcinoma de glândulas salivares, câncer de rim como carcinoma celular renal e tumores de Wilms, carcinoma de células

basais, melanoma, câncer de próstata, câncer vulval, câncer de tiroide, câncer testicular, câncer de esôfago, vários tipos de câncer de cabeça e pescoço e cânceres de origens mucosas, como, câncer ovariano mucinoso, colangiocarcinoma (fígado) e carcinoma papilar renal.

[0106] Como usado aqui, o termo "carcinomas" se refere a cânceres de células epiteliais, que são células que cobrem a superfície do corpo, produzem hormônios, e constituem glândulas. Exemplos de carcinomas são cânceres da pele, pulmão, cólon, estômago, mama, próstata e glândula tiroide.

[0107] O termo "mutação KRAS", como usado aqui, se refere a mutações encontrados em alguns cânceres em um homólogo humano do oncogene viral de sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten. Exemplos não limitativos de sequências mRNA de gene KRAS humano incluem Genbank Accession Nos. NM004985 e NM033360. Foi relatado que as mutações KRAS são encontradas em 73% de tumores pancreáticos, 35% de tumores colorretais, 16% de tumores ovarianos e 17% de tumores de pulmão. A mutação KRAS geralmente ocorre em códons 12 ou 143 do gene KRAS humano.

[0108] "Polinucleotídeo", ou "ácido nucleico", como usado de maneira intercambiável aqui, se refere a polímeros de nucleotídeos de qualquer comprimento, e incluem DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos ou bases modificadas, e/ou seus análogos, ou qualquer substrato que possa ser incorporado em um polímero por DNA ou RNA polimerase. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, como nucleotídeos metilados e seus análogos. A descrição anterior se aplica a todos os polinucleotídeos referidos aqui, inclusive RNA e DNA.

[0109] O termo "vetor" significa uma construção, que é capaz de distribuir, e em alguns aspectos, expressar, um ou mais gene(s) ou sequência(s) de interesse em uma célula hospedeira. Exemplos de

vetores incluem, mas sem se limitarem a, vetores virais, vetores de expressão de DNA ou RNA nus, vetores de plasmídeo, cosmídeo ou fago, vetores de expressão de DNA ou RNA associados a agentes de condensação catiônicos, vetores de expressão de DNA ou RNA encapsulados em lipossomos, e algumas células eucarióticas, como células produtoras.

[0110] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo", e "proteína" são usados de maneira intercambiável aqui para se referirem a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, esse pode compreender aminoácidos modificados, e esse pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também incluem um polímero de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, como a conjugação com um componente de marcação. Também estão incluídos dentro da definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (inclusive, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. entende-se que, devido ao fato de os polipeptídeos dessa invenção serem baseados em anticorpos, em alguns aspectos, os polipeptídeos podem ocorrer como cadeias simples ou cadeias associadas.

[0111] Os termos "idêntico" ou porcentagem de "identidade" no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou possuem uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido que é igual, quando comparados e alinhados (introduzindo lacunas, se necessário) para correspondência máxima, não considerando quaisquer substituições de aminoácido conservativas como parte da identidade de sequência. A porcentagem de identidade

pode ser medida utilizando software ou algoritmos de comparação de sequência ou por inspeção visual. Vários algoritmos e software conhecidos na técnica podem ser usados para obter alinhamentos de sequências de aminoácido ou nucleotídeo.

[0112] Um exemplo não limitativo de um algoritmo de alinhamento de sequência é o algoritmo descrito em Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, como modificado em Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, e incorporado nos programas NBLAST e XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). Em alguns aspectos, Gapped BLAST pode ser usado como descrito em Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou Megalign (DNASTAR) são programas de software adicionais publicamente disponíveis que podem ser usados para alinhar sequências. Em alguns aspectos, a porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleotídeo é determinada utilizando o programa GAP no pacote de software GCG (*por exemplo*, utilizando uma matriz NWGapDNA.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70, ou 90 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6). Em alguns aspectos alternativos, o programa GAP no pacote de software GCG, que incorpora o algoritmo de Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) pode ser usado para determinar a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácido (*por exemplo*, utilizando uma matriz BLOSUM 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, em alguns aspectos, a porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeo ou aminoácido é determinada utilizando o algoritmo de Myers e Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por exemplo, a porcentagem de identidade pode ser

determinada utilizando o programa ALIGN (versão 2.0) e utilizando um PAM120 com a tabela de resíduos, uma penalidade de comprimento de lacunas de 12 e uma penalidade de lacunas de 4. Parâmetros apropriados para o alinhamento máximo por software de alinhamento particular podem ser determinados por um elemento versado na técnica. Em alguns aspectos, os parâmetros padrão do software de alinhamento são usados.

[0113] Em alguns aspectos, a porcentagem de identidade "X" de uma primeira sequência de aminoácido a uma segunda sequência aminoácido é calculada como $100 \times (Y/Z)$, onde Y é o número de resíduos de aminoácido pontuado como correspondências idênticas no alinhamento das primeira e segunda sequências (como alinhadas por inspeção visual ou um programa de alinhamento de sequência particular) e Z é o número total de resíduos na segunda sequência. Se o comprimento de uma primeira sequência for maior que a segunda sequência, a porcentagem de identidade da primeira sequência à segunda sequência será maior do que a porcentagem de identidade da segunda sequência à primeira sequência.

[0114] Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que possui uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido que possuem cadeias laterais similares foram definidas na técnica, inclusive cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (*por exemplo*, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (*por exemplo*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*, tirosina, fenilalanina,

triptofano, histidina). Por exemplo, a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina é uma substituição conservativa. Em alguns aspectos, as substituições conservativas nas sequências dos polipeptídeos e anticorpos da invenção não anulam a ligação do polipeptídeo ou anticorpo contendo a sequência de aminoácido, ao(s) antígeno(s), *isto é*, a HER3 à qual o polipeptídeo ou anticorpo se liga. Métodos de identificar as substituições conservativas de nucleotídeo e aminoácido que não eliminam a ligação ao antígeno são bem conhecidos na técnica (veja, *por exemplo*, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); e Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0115] O termo "sequência consenso", como usado aqui em relação a regiões variáveis de cadeia leve (VL) e cadeia pesada (VH), se refere a uma sequência VL ou VH compósita ou genericizada definida com base nas informações às quais os resíduos de aminoácido dentro da cadeia VL ou VH são receptivos para a modificação sem danos à ligação ao antígeno. Assim, em uma "sequência consenso" para uma cadeia VL ou VH, algumas posições de aminoácido são ocupadas por um entre múltiplos resíduos de aminoácido possíveis nessa posição. Por exemplo, se uma arginina (R) ou uma serina (S) se apresentar em uma posição particular, então essa posição particular dentro da sequência consenso pode ser arginina ou serina (R ou S). As sequências consenso da cadeia VH e VL podem ser definidas, por exemplo, por maturação de afinidade *in vitro* (*por exemplo*, randomizar cada posição de aminoácido em uma determinada CDR utilizando iniciadores de codificação degenerados), por mutagênese de varredura (*por exemplo*, mutagênese de varredura de alanina) de resíduos de aminoácido dentro das CDRs de anticorpo, ou quaisquer outros métodos conhecidos na técnica, seguido pela avaliação da ligação dos mutantes ao antígeno para determinar se a posição de aminoácido modificada afeta a ligação ao

antígeno. Em alguns aspectos, as mutações são introduzidas nas regiões CDR. Em outros aspectos, as mutações são introduzidas nas regiões de estrutura. Em alguns outros aspectos, as mutações são introduzidas nas regiões CDR e de estrutura.

II. Moléculas de ligação anti-HER3

[0116] A presente invenção fornece moléculas de ligação HER3, *por exemplo*, anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno desses que se ligam especificamente a HER3. As sequências de aminoácido (aa) e nucleotídeo (nt) de comprimento total de HER3 são conhecidas na técnica (veja, *por exemplo*, UniProt Acc. No. P2186 para HER3 humano, ou UniProt Acc. No. O88458 para HER3 de camundongo). Em alguns aspectos, as moléculas de ligação anti-HER3 são anticorpos humanos. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação HER3 são anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses compreendem um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um Fd, um Fv de cadeia simples ou scFv, um Fv ligado a dissulfeto, um domínio V-NAR, um IgNar, um intrabody, um IgG□CH2, um minibody, um F(ab')₃, um tetrabody, um triabody, um diabody, um anticorpo de domínio único, DVD-Ig, Fcab, mAb², um (scFv)₂, ou um scFv-Fc. Em alguns aspectos, o anticorpo é do subtipo IgG1 e compreende o triplo mutante YTE, como descrito acima na seção de Definições.

[0117] Em alguns aspectos, os anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses da invenção são modificados comparado com o anticorpo Clone 16 original (CL16). As modificações podem incluir mutações nas regiões CDR e/ou nas regiões FW como comparado com CL16. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 da invenção compreende modificações em CDR1 e/ou CDR3 da cadeia leve de CL16, inclusive, porém sem se limitarem a:

1) uma cadeia leve CDR1 que comprehende a sequência consenso X₁GSX₂SNIGLNYVS, em que X₁ é selecionado a partir de R ou S, e X₂ é selecionado a partir de S ou L; e

2) uma cadeia leve CDR3 que comprehende a sequência consenso AAWDDX₃X₄X₅GEX₆, em que X₃ é selecionado a partir de S ou G, X₄ é selecionado a partir de L ou P, X₅ é selecionado a partir de R, I, P ou S, e X₆ é selecionado a partir de V ou A.

[0118] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção comprehende modificações em CDR2 da cadeia pesada de CL16, inclusive, mas sem se limitarem a, uma cadeia pesada CDR1 que comprehende a sequência consenso X₇IGSSGGVTNYADSVKG, em que X₇ é selecionado a partir de Y, I ou V.

[0119] Em um aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse comprehende uma região VL que comprehende a sequência de aminoácido consenso:

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃
X₄X₅GEX₆[FW₄]

em que [FW₁], [FW₂], [FW₃] e [FW₄] representam os resíduos de aminoácido de região de estrutura VL 1 (SEQ ID NO: 40 ou 44), região de estrutura VL 2 (SEQ ID NO: 41), região de estrutura VL 3 (SEQ ID NO: 42) e região de estrutura VL 4 (SEQ ID NO: 43), e em que X₁ representa os resíduos de aminoácido arginina (R) ou serina (S), X₂ representa os resíduos de aminoácido serina (S) ou leucina (L), X₃ representa os resíduos de aminoácido serina (S) ou ácido glutâmico (E), X₄ representa os resíduos de aminoácido leucina (L) ou prolina (P), X₅ representa os resíduos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) ou serina (S), e X₆ representa os resíduos de aminoácido valina (V) ou arginina (R).

[0120] Em um aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse comprehende uma região VH que comprehende a sequência de aminoácido consenso:

[FW₅]YYYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGD
AFDI[FW₈]

em que [FW₅], [FW₆], [FW₇] e [FW₈] representam os resíduos de aminoácido de região de estrutura VH 1 (SEQ ID NO: 36), região de estrutura VH 2 (SEQ ID NO: 37), região de estrutura VH 3 (SEQ ID NO: 38) e região de estrutura VH 4 (SEQ ID NO: 39), e em que X₇ representa os resíduos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) ou valina (V).

[0121] Em um aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse compreende uma região VL que compreende a sequência de aminoácido consenso:

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃
X₄X₅GEX₆[FW₄]

em que [FW₁], [FW₂], [FW₃] e [FW₄] representam os resíduos de aminoácido da região de estrutura VL 1 (SEQ ID NO: 40 ou 44), região de estrutura VL 2 (SEQ ID NO: 41), região de estrutura VL 3 (SEQ ID NO: 42) e região de estrutura VL 4 (SEQ ID NO: 43), e em que X₁ representa os resíduos de aminoácido arginina (R) ou serina (S), X₂ representa os resíduos de aminoácido serina (S) ou leucina (L), X₃ representa os resíduos de aminoácido serina (S) ou ácido glutâmico (E), X₄ representa os resíduos de aminoácido leucina (L) ou prolina (P), X₅ representa os resíduos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) ou serina (S), e X₆ representa os resíduos de aminoácido valina (V) ou arginina (R); e em que o dito anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse compreende adicionalmente uma região VH que compreende a sequência de aminoácido consenso:

[FW₅]YYYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGD
AFDI[FW₈]

em que [FW₅], [FW₆], [FW₇] e [FW₈] representam os resíduos de aminoácido da região de estrutura VH 1 (SEQ ID NO: 36), região de estrutura VH 2 (SEQ ID NO: 37), região de estrutura VH 3 (SEQ ID NO:

38) e região de estrutura VH 4 (SEQ ID NO: 39), e em que X₇ representa os resíduos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) ou valina (V).

[0122] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR2 que consiste em SEQ ID NO: 21. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR2 que compreende a SEQ ID NO: 21. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR3 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR3 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30.

[0123] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que consiste em SEQ ID NO: 31. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que compreende a SEQ ID NO: 31. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende a VH-CDR2 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID

NOs: 32, 33 e 34. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR2 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR3 que consiste em SEQ ID NO: 35. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 35.

[0124] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR2 que consiste em SEQ ID NO: 21, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR2 que compreende a SEQ ID NO: 21, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR3 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-

HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR3 que compreende a sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido.

[0125] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende a VH-CDR1 que consiste em SEQ ID NO: 31, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que compreende a SEQ ID NO: 31, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR2 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR2 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR3 que consiste em SEQ ID NO: 35, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR3 que compreende SEQ ID NO: 35, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido.

[0126] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1

que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20; a VL-CDR2 que consiste em SEQ ID NO: 21; e a VL-CDR3 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20; uma VL-CDR2 que compreende SEQ ID NO: 21; e uma VL-CDR3 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30.

[0127] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que consiste em SEQ ID NO: 31; uma VH-CDR2 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34; e uma VH-CDR3 que consiste em SEQ ID NO: 35. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que compreende a SEQ ID NO: 31; uma VH-CDR2 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34; uma VH-CDR3 que compreende SEQ ID NO: 35.

[0128] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; a VL-CDR2 que consiste em SEQ ID NO: 21, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; e uma VL-CDR3 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30, exceto para uma, duas, três ou quatro

substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL-CDR1 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 19 e 20, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; uma VL-CDR2 que compreende a SEQ ID NO: 21, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; e uma VL-CDR3 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido.

[0129] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VH-CDR1 que consiste em SEQ ID NO: 31, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; uma VH-CDR2 que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; e uma VH-CDR3 que consiste em SEQ ID NO: 35, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse anticorpo da invenção compreende uma VH-CDR1 que compreende a SEQ ID NO: 31, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; uma VH-CDR2 que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; e VH-CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 35, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido.

[0130] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende modificações to CDR1, CDR2, e/ou CDR3 da cadeia pesada e/ou leve, e compreende adicionalmente modificações em FW1, FW2, FW3, e/ou FW4 da cadeia

pesada e/ou leve. Em alguns aspectos, FW₁ compreende SEQ ID NO: 40 ou 44, FW₂ compreende SEQ ID NO: 41, FW₃ compreende SEQ ID NO: 42, FW₄ compreende SEQ ID NO: 43, FW₅ compreende SEQ ID NO: 36, FW₆ compreende SEQ ID NO: 37, FW₇ compreende SEQ ID NO: 38, e FW₈ compreende SEQ ID NO: 39.

[0131] Em alguns aspectos, FW₁ compreende SEQ ID NO: 40 ou 44, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₂ compreende SEQ ID NO: 41, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₃ compreende SEQ ID NO: 42, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₄ compreende SEQ ID NO: 43, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₅ compreende SEQ ID NO: 36, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₆ compreende SEQ ID NO: 37, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; FW₇ compreende SEQ ID NO: 38, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido; e FW₈ compreende SEQ ID NO: 39, exceto para uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido.

[0132] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende a VL e uma VH que compreende VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, e VH-CDR3 sequências de aminoácido idênticas ou idênticas exceto para quatro, três, duas, ou uma substituição de aminoácido em uma ou mais CDRs à: SEQ ID NOS: 18, 21, 22, 31, 32, e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 26, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 27, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 20, 21, 22, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 19, 21, 22, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 25, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 28, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 29, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 30, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 19, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 20, 21, 23, 31, 32 e 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 24, 31,

32 e 35, ou SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 31, 32 e 35, respectivamente.

[0133] Os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção incluem as sequências listadas na TABELA 2.

TABELA 2

SEQ ID NO.	Descrição	Sequência
1	CL16VL (de linha germinativa)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEV FGGGTKLTVL
17	CL16VL (original)	QYELTQPPSASGTPGQRVTMSCGSSSNIGLNY VSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGE VFGGGTKLTVL
2	CL16 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYY MQWVRQAPGKGLEWVSYIGSSGGVTNYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLGDAFDIWGQGTMVTVSS
4	5H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDGLPGEV FGGGTKLTVL
5	8A3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLIGEVF GGGTKLTVL

SEQ ID NO.	Descrição	Sequência
6	4H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEV FGGGTKLTVL
7	6E.3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEV FGGGTKLTVL
8	2B11 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLPGEV FGGGTKLTVL
9	2D1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEA FGGGTKLTVL
10	3A6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEV FGGGTKLTVL
11	4C4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGLNYV SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGEV FGGGTKLTVL

SEQ ID NO.	Descrição	Sequência
12	15D12.1 (15D12.I) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYY MQWVRQAPGKGLEWVSIIGSSGGVTNYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLGDAFDIWGQGTMVTVSS
13	15D12.2 (15D12.V) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYY MQWVRQAPGKGLEWVSVIGSSGGVTNYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLGDAFDIWGQGTMVTVSS
14	1A4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLN SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPGEA FGGGTKLTVL
3	2C2 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSLNIGLN SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPGEA FGGGTKLTVL
15	3E.1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGSSSNIGLN SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPGEA FGGGTKLTVL
16	2F10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLN SWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEA FGGGTKLTVL

[0134] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento

de ligação ao antígeno desse da invenção compreende um anticorpo VL e um anticorpo VH, em que a VL compreende uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, e SEQ ID NO: 17.

[0135] Em outros aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende um anticorpo VL e um anticorpo VH, em que a VH compreende uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

[0136] Em outros aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende uma VL que compreende uma sequência pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, e SEQ ID NO: 17, e compreende adicionalmente uma VH que compreende uma sequência pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntica a uma sequência de

aminoácido de referência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

[0137] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse compreende uma VH da TABELA 2 e uma VL da TABELA 2. Os anticorpos são designados ao longo do relatório descritivo de acordo com suas cadeias VL. As cadeias pesadas dos anticorpos específicos descrito no presente relatório descritivo correspondem à cadeia pesada original CL16 (SEQ ID NO: 2). Assim, o "anticorpo CL16" é uma IgG1 que compreende duas cadeias leves CL16 originais (SEQ ID NO: 17) e duas cadeias pesadas originais CL16 (SEQ ID NO: 2), enquanto o "anticorpo 2C2" é uma IgG1 que compreende duas cadeias leves 2C2 (2C2 VL (SEQ ID NO: 3) e duas cadeias pesadas originais CL16 (SEQ ID NO: 2).

[0138] Em alguns aspectos, o anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse compreende uma região constante de cadeia pesada ou fragmento dessa. Em alguns aspectos específicos, a região constante de cadeia pesada é uma região constante IgG. A região constante IgG pode compreender uma região constante de cadeia leve selecionada a partir do grupo que consiste em uma região constante kappa e uma região constante lambda.

[0139] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção liga o HER3 com substancialmente a mesma afinidade ou maior que o anticorpo CL16, que compreende a cadeia pesada original CL16 (SEQ ID NO: 2) e a cadeia leve CL16 original (SEQ ID NO: 17). Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção liga o HER3 com substancialmente a mesma afinidade ou maior que o anticorpo 2C2, que compreende a cadeia leve 2C2 (2C2 VL (SEQ ID NO: 3) e a cadeia pesada original CL16 (SEQ ID NO: 2).

[0140] Em um aspecto da presente invenção, um anticorpo anti-

HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse se liga especificamente a HER3 e fragmentos antigênicos desses com uma constante de dissociação de k_d (k_{off}/k_{on}) menor que 10^{-6} M, ou menor que 10^{-7} M, ou menor que 10^{-8} M, ou menor que 10^{-9} M, ou menor que 10^{-10} M, ou menor que 10^{-11} M, ou menor que 10^{-12} M, ou menor que 10^{-13} M. Em um aspecto particular da presente invenção, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse se liga especificamente a HER3 e os fragmentos antigênicos desse com uma constante de dissociação entre 2×10^{-10} M e 6×10^{-10} M.

[0141] Em outro aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção se liga a HER3 e/ou fragmentos antigênicos desse com uma K_{off} menor que 1×10^{-3} s $^{-1}$, ou menor que 2×10^{-3} s $^{-1}$. Ainda em outros aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse se liga a HER3 e fragmentos antigênicos desse com uma K_{off} menor que 10^{-3} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-3} s $^{-1}$, menor que 10^{-4} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-4} s $^{-1}$, menor que 10^{-5} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-5} s $^{-1}$, menor que 10^{-6} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-6} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-7} s $^{-1}$, menor que 10^{-8} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-8} s $^{-1}$, menor que 10^{-9} s $^{-1}$, menor que 5×10^{-9} s $^{-1}$, ou menor que 10^{-10} s $^{-1}$. Em um aspecto particular, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção se liga a HER3 e/ou fragmentos antigênicos desse com uma K_{off} entre $0,5 \times 10^{-4}$ s $^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ s $^{-1}$.

[0142] Em outro aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção se liga a HER3 e/ou fragmentos antigênicos desse com uma constante de taxa de associação ou taxa k_{on} de pelo menos 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$, pelo menos 5×10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$, pelo menos 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$, pelo menos 5×10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$, pelo menos 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$, pelo menos 5×10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$, ou pelo menos 10^8 M $^{-1}$ s $^{-1}$, ou pelo menos 10^9 M $^{-1}$ s $^{-1}$. Em outro aspecto, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção se liga a HER3 e/ou fragmentos

antigênicos desse com uma constante de taxa de associação ou taxa de k_{on} entre $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0143] As sequências VH e VL descritas na TABELA 1 podem ser "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-HER3 da invenção. Em alguns aspectos, as sequências VH de 15D12.I e 15D12.V são misturadas e combinadas. Adicionalmente ou alternativamente, as sequências VL de 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6, 4C4, 1A4, 2C2, 3E.1 podem ser misturadas e combinadas.

[0144] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende mutações que aumentam a ligação a FcRn humano e aumentam a meia-vida do anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse. Em alguns aspectos, essas mutações consistem em uma mutação de metionina (M) para tirosina (Y) na posição 252, uma mutação de serina (S) para treonina (T) na posição 254, e uma mutação de treonina(T) para ácido glutâmico (E) na posição 256, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat (Kabat, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introduzida no domínio constante de uma IgG1. Veja, Patente No. U.S. 7.658.921, que está aqui incorporada a título de referência. Esse tipo de IgG mutante, referido como um "mutante YTE" se revelou exibir aproximadamente um aumento de quatro vezes na meia-vida como comparado com versões tipo selvagem do mesmo anticorpo (Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse que compreende um domínio constante IgG compreende uma ou mais substituições de aminoácido de resíduos de aminoácido nas posições 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, e 428-436, numeradas de acordo com o índice EU como em Kabat, em que essas mutações aumentam a meia-vida no soro do anticorpo anti-HER3

ou fragmento de ligação ao antígeno desse.

[0145] Em alguns aspectos, um mutante YTE que comprehende adicionalmente uma substituição na posição 434 do domínio constante IgG, numerado de acordo com o índice EU como em Kabat, por um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em triptofano (W), metionina (M), tirosina (Y), e serina (S). Em outros aspectos, um mutante YTE comprehende adicionalmente uma substituição na posição 434 do domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em triptofano (W), metionina (M), tirosina (Y), e serina (S), e substituição na posição 428 do domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em treonina(T), leucina (L), fenilalanina (F), e serina (S).

[0146] Ainda em outro aspecto, um mutante comprehende adicionalmente uma substituição na posição 434 do domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por tirosina (Y), e uma substituição na posição 257 do domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por leucina (L). Em alguns aspectos, um mutante comprehende adicionalmente uma substituição na posição 434 domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por serina (S), e uma substituição na posição 428 domínio constante de IgG, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat, por leucina (L).

[0147] Em um aspecto específico, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse comprehende uma região variável de cadeia leve 2C2 (2C2 VL; SEQ ID NO: 3), uma região variável CL16 original de cadeia pesada (SEQ ID NO: 2), e um domínio constante IgG1 que comprehende uma mutação de metionina (M) para tirosina (Y) na posição 252, uma mutação de serina (S) para treonina

(T) na posição 254, e uma mutação de treonina (T) para ácido glutâmico (E) na posição 256 do domínio constante IgG1, numerada de acordo com o índice EU como em Kabat.

[0148] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção compreende pelo menos uma substituição de aminoácido de domínio constante IgG selecionada a partir do grupo que consiste em:

- (a) substituição do aminoácido na posição 252 por tirosina (Y), fenilalanina (F), triptofano (W), ou treonina(T),
- (b) substituição do aminoácido na posição 254 por treonina(T),
- (c) substituição do aminoácido na posição 256 por serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutâmico (E), ácido aspártico (D), ou treonina(T),
- (d) substituição do aminoácido na posição 257 por leucina (L),
- (e) substituição do aminoácido na posição 309 por prolina (P),
- (f) substituição do aminoácido na posição 311 por serina (S),
- (g) substituição do aminoácido na posição 428 por treonina(T), leucina (L), fenilalanina (F), ou serina (S),
- (h) substituição do aminoácido na posição 433 por arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P), ou glutamina (Q),
- (i) substituição do aminoácido na posição 434 por triptofano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F), ou tirosina, e
- (j) uma combinação de duas ou mais substituições, em que as posições são numeradas de acordo com o índice EU como em Kabat, e em que a IgG modificada possui uma meia-vida no soro aumentada comparado com a meia-vida no soro de uma IgG que possui o domínio constante IgG tipo selvagem.

[0149] Em outros aspectos, as sequências de aminoácido VH e/ou

VL podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% similares às sequências apresentadas acima, e compreendem 1, 2, 3, 4, 5 ou mais substituições conservativas. Um anticorpo HER3 que possui as regiões VH e VL que possuem alta (*isto é*, 80% ou mais) similaridade às regiões VH da SEQ ID NOs: 2, 12 ou 13 e/ou regiões VL da SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, ou 17, respectivamente, pode ser obtido por mutagênese (por exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codificam a SEQ ID NOs: 1-17, seguido pelo teste do anticorpo alterado codificado para a função retida utilizando os ensaios funcionais descritos aqui.

[0150] A afinidade ou avidez de um anticorpo para um antígeno pode ser determinada experimentalmente utilizando qualquer método adequado bem conhecido na técnica, *por exemplo*, citometria de fluxo, ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), ou radioimuno-ensaio (RIA), ou cinética (*por exemplo*, análise BIACORE™). Os ensaios de ligação direta bem como formatos de ensaios de ligação competitiva podem ser facilmente empregados. (Veja, por exemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman e Company: New York, N.Y. (1992); e métodos descritos aqui. A afinidade medida de uma interação anticorpo-antígeno particular pode variar se medida sob condições diferentes (*por exemplo*, concentração de sal, pH, temperatura). Assim, as medidas de afinidade e outros parâmetros de ligação ao antígeno (*por exemplo*, K_D ou K_d , K_{on} , K_{off}) são feitas com soluções padronizadas de anticorpo e antígeno, e um tampão padronizado, como conhecido na técnica e como o tampão descrito aqui.

[0151] Também é conhecido na técnica que as afinidades medidas utilizando a análise BIACORE™ podem variar dependendo de qual dos reagentes está ligado ao chip. Nesse aspecto, a afinidade pode ser

medida utilizando um formato em que o anticorpo alvo (*por exemplo*, o anticorpo monoclonal 2C2) é imobilizado sobre o chip (referido como um formato "IgG down") ou utilizando um formato em que a proteína alvo (*por exemplo*, HER3) é imobilizada sobre o chip (referido como, *por exemplo*, um formato "HER3 down").

III. Moléculas de Ligação que se Ligam ao Mesmo Epítopo que os Anticorpos anti-HER3 e Fragmentos de ligação ao antígeno Desses da Invenção

[0152] Em outro aspecto, a invenção compreende moléculas de ligação a HER3 que se ligam ao mesmo epítopo que vários anticorpos anti-HER3 descritos aqui. O termo "epítopo" como usado aqui se refere a um determinante de proteína capaz de se ligar a um anticorpo da invenção. Os epítopos consistem geralmente em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Os epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos pelo fato de que a ligação ao formador, porém não ao último é perdida na presença de solventes desnaturantes. Esses anticorpos podem ser identificados com base em sua capacidade de competição cruzada (*por exemplo*, de inibir competitivamente a ligação, de maneira estatisticamente significativa) com anticorpos como o anticorpo CL16, o anticorpo 2C2, ou o mutante 2C2-YTE, em ensaios de ligação a HER3 padrão. Consequentemente, em um aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-HER3 e fragmentos de ligação ao antígeno desses, *por exemplo*, anticorpos monoclonais humanos, que competem pela ligação a HER3 com outro anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção, como o anticorpo CL16 ou o anticorpo 2C2. A capacidade de um anticorpo de teste inibir a ligação, *por exemplo*, do anticorpo CL16 ou do anticorpo 2C2

demonstra que o anticorpo de teste pode competir com aquele anticorpo pela ligação a HER3; visto que um anticorpo pode, de acordo com uma teoria não limitativa, se ligar ao mesmo ou um epítopo relacionado (*por exemplo*, um estruturalmente similar ou espacialmente próximo) em HER3 como o anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse com o qual esse compete. Em um aspecto, o anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse que se liga ao mesmo epítopo em HER3 como, *por exemplo*, o anticorpo CL16 ou o anticorpo 2C2, é um anticorpo monoclonal humano.

IV. Mecanismo de Ação

[0153] Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3. Em outros aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de AKT. Ainda em outros aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a formação de dímero HER2-HER3. Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir crescimento celular. Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse não possui efeito ADCC. Em aspectos específicos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3, fosforilação de AKT, e/ou a formação de colônia de tumor através de um mecanismo de ação independente de ligante.

[0154] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células MCF-7 de

câncer de mama ativadas por HRG como medido por ELISA, com uma IC₅₀ menor que cerca de 30 ng/mL, menor que cerca de 25 ng/mL, menor que cerca de 20 ng/mL, menor que cerca de 15 ng/mL, ou menor que cerca de 10 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células MCF-7 de câncer de mama ativadas por HRG como medido por ELISA, com uma IC₅₀ menor que cerca de 20 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células MCF-7 de câncer de mama ativadas por HRG como medido por ELISA, com uma IC₅₀ menor que cerca de 15 ng/mL. Em outro aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células MCF-7 de câncer de mama ativadas por HRG como medido por ELISA, com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL.

[0155] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de câncer de mama MDA-MB-175 com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,90 µg/mL, menor que cerca de 0,80 µg/mL, menor que cerca de 0,70 µg/mL, menor que cerca de 0,60 µg/mL, menor que cerca de 0,50 µg/mL, menor que cerca de 0,40 µg/mL, menor que cerca de 0,30 µg/mL, ou menor que cerca de 0,20 µg/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de câncer de mama MDA-MB-175, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,50 µg/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de

ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de câncer de mama MDA-MB-175, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,40 µg/mL. Em outro aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de câncer de mama MDA-MB-175, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,30 µg/mL. Em outro aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de câncer de mama MDA-MB-175, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,20 µg/mL.

[0156] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de melanoma HMGB com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,20 µg/mL, menor que cerca de 0,15 µg/mL, menor que cerca de 0,10 µg/mL, menor que cerca de 0,05 µg/mL, menor que cerca de 0,04 µg/mL, ou menor que cerca de 0,03 µg/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de melanoma HMGB, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,10 µg/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir crescimento celular em células de melanoma HMGB, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,05 µg/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de melanoma HMGB, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,04 µg/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação

ao antígeno desse pode suprimir o crescimento celular em células de melanoma HMCB, com uma IC₅₀ menor que cerca de 0,03 µg/mL.

[0157] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR com uma IC₅₀ menor que cerca de 20 ng/mL, menor que cerca de 15 ng/mL, menor que cerca de 10 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL, ou menor que cerca de 2 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR, com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR, com uma IC₅₀ menor que cerca de 8 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR, com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR, com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR, com uma IC₅₀ menor que cerca de 2 ng/mL.

[0158] Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3, *por*

exemplo, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR resistentes a TKI com uma IC₅₀ menor que cerca de 30 ng/mL, menor que cerca de 25 ng/mL, menor que cerca de 20 ng/mL, menor que cerca de 15 ng/mL, menor que cerca de 10 ng/mL, ou menor que cerca de 5 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR resistentes a TKI, com uma IC₅₀ menor que cerca de 20 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR resistentes a TKI, com uma IC₅₀ menor que cerca de 15 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR resistentes a TKI, com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de câncer de pulmão HCC827 ativadas por EGFR resistentes a TKI, com uma IC₅₀ menor que cerca de 5 ng/mL.

[0159] Em alguns aspectos específicos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode ser usada para tratar cânceres resistentes a TKI.

[0160] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de

adenocarcinoma gástricas humanas MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 15 ng/mL, menor que cerca de 10 ng/mL, menor que cerca de 9 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 7 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, ou menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de adenocarcinoma gástricas humanas MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de adenocarcinoma gástricas humanas MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 8 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de adenocarcinoma gástricas humanas MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir a fosforilação de HER3 em células de adenocarcinoma gástricas humanas MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL.

[0161] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir pAKT em células MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 15 ng/mL, menor que cerca de 10 ng/mL, menor que cerca de 9 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 7 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL, ou menor que cerca de 3 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3,

por exemplo, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 8 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células MKN45 ativadas por cMET com uma IC₅₀ menor que cerca de 3 ng/mL.

[0162] Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 9 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 7 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL, menor que cerca de 3 ng/mL, menor que cerca de 2 ng/mL, ou menor que cerca de 1 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 5 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀

menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 3 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 2 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER em células de carcinoma em anel de sinete gástricas humanas Kato III ativadas por FGFR2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 1 ng/mL.

[0163] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células Kato III ativadas por FGFR-2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL, menor que cerca de 3 ng/mL, menor que cerca de 2 ng/mL, ou menor que cerca de 1 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células Kato III ativadas por FGFR-2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células Kato III ativadas por FGFR-2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 3 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células Kato III ativadas por FGFR-2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 2 ng/mL.

cerca de 2 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células Kato III ativadas por FGFR-2 com uma IC₅₀ menor que cerca de 1 ng/mL.

[0164] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir pHET em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL, menor que cerca de 9 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 7 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHET em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 8 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHET em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHET em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL.

[0165] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir pAKT em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 10 ng/mL, menor que cerca de 9 ng/mL, menor que cerca de 8 ng/mL, menor que cerca de 7 ng/mL, menor que cerca de 6 ng/mL, menor que cerca de 5 ng/mL, menor que cerca de 4 ng/mL. Em um aspecto

específico, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 8 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 6 ng/mL. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pAKT em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante com uma IC₅₀ menor que cerca de 4 ng/mL. Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode suprimir pHER3, pAKT, e a formação de colônia de tumor em células BT-474, um modelo de câncer de mama independente de ligante.

[0166] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir a secreção VEGF induzida por HRG. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode suprimir a secreção de VEGF induzida por HRG em células de câncer de mama BT-474 independentes de ligante e/ou células MCF-7 de câncer de mama ativadas por HRG.

[0167] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode causar a interrupção de ciclo celular. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode causar a interrupção de ciclo celular em células de

câncer de mama, inclusive, mas sem se limitarem a, células SKBR3 ou BT474.

V. Preparação de Anticorpos Anti-HER3 e Fragmentos de Ligação ao Antígeno

[0168] Os anticorpos monoclonais anti-HER3 podem ser preparados utilizando métodos de hibridoma, como aqueles descritos por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495. Utilizando-se o método de hibridoma, um camundongo, hamster, ou outro animal hospedeiro apropriado, é imunizado como descrito acima para obter a produção por linfócitos de anticorpos que irão se ligar especificamente a um antígeno imunizante. Os linfócitos também podem ser imunizados *in vitro*. Após a imunização, os linfócitos são isolados e fundidos com uma linhagem celular de mieloma adequada utilizando, por exemplo, polietileno glicol, para formar células de hibridoma que podem ser selecionadas a partir de linfócitos não fundidos e células de mieloma. Os hibridomas que produzem anticorpos monoclonais especificamente dirigidos contra um antígeno selecionado como determinado por imunoprecipitação, imunotransferência, ou por um ensaio de ligação *in vitro* (*por exemplo*, radioimunoensaio (RIA); ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)) podem ser então propagados em cultura *in vitro* utilizando métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles e Practice*, Academic Press, 1986) ou *in vivo* como tumores de ascites em um animal. Os anticorpos monoclonais podem ser então purificados a partir do meio de cultura ou fluido de ascites como descrito para anticorpos policlonais acima.

[0169] Alternativamente, os anticorpos monoclonais anti-HER3 também podem ser feitos utilizando métodos de DNA recombinante como descrito na Patente No. U.S. 4.816.567. Os polinucleotídeos que codificam um anticorpo monoclonal são isolados de células B maduras ou célula de hibridoma, como por RT-PCR utilizando iniciadores de

oligonucleotídeo que amplificam especificamente os genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo, e sua sequência é determinada utilizando procedimentos convencionais. Os polinucleotídeos isolados que codificam as cadeias pesadas e leves são então clonados formando vetores de expressão adequados, que quando transfetados em célula hospedeiras como células *E. coli*, células COS de símio, células ovarianas de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem proteína de imunoglobulina, anticorpos monoclonais são gerados pelas células hospedeiras. Também, os anticorpos monoclonais anti-HER3 recombinantes ou fragmentos de ligação ao antígeno desses das espécies desejadas podem ser isolados de bibliotecas de exibição de fago que expressam CDRs das espécies desejadas como descrito (McCafferty *et al.*, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson *et al.*, 1991, Nature, 352:624-628; e Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0170] O(s) polinucleotídeo(s) que codifica(m) um anticorpo anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desse pode(m) ser adicionalmente modificado(s) de inúmeras maneiras diferentes utilizando tecnologia de DNA recombinante para gerar anticorpos alternativos. Em alguns aspectos, os domínios constantes das cadeias leves e pesadas, por exemplo, de um anticorpo monoclonal de camundongo podem ser substituídos (1) por aquelas regiões, por exemplo, de um anticorpo humano para gerar um anticorpo quimérico ou (2) um polipeptídeo não imunoglobulina para gerar um anticorpo de fusão. Em alguns aspectos, as regiões constantes são truncadas ou removidas para gerar o fragmento de anticorpo desejado de um anticorpo monoclonal. A mutagênese sítio-dirigida ou de alta-densidade da região variável pode ser usada para otimizar a especificidade, afinidade, etc. de um anticorpo monoclonal.

[0171] Em alguns aspectos, o anticorpo anti-HER3 ou fragmento de

ligação ao antígeno desse é um anticorpo humano ou fragmento de ligação ao antígeno desse. Os anticorpos humanos podem ser diretamente preparados utilizando várias técnicas conhecidas. Linfócitos B humanos imortalizados imunizados *in vitro* ou isolados de um indivíduo imunizado que produzem um anticorpo dirigido contra um antígeno alvo podem ser gerados (veja, *por exemplo*, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies e Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; e U.S. Patent 5,750,373).

[0172] Também, o anticorpo humano anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode ser selecionado a partir de uma biblioteca de fago, onde essa biblioteca de fago expressa anticorpos humanos, como descrito, por exemplo, em Vaughan *et al.*, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets *et al.*, 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom e Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, e Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Técnicas para a geração e uso de bibliotecas de fago de anticorpo também são descritas na Patente Nos. U.S. 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; e 7.264.963; e Rothe *et al.*, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (cada uma está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade).

[0173] Estratégias de maturação de afinidade e estratégias de embaralhamento de cadeia (Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:779-783, incorporadas a título de referência em sua totalidade) são conhecidas na técnica e podem ser empregadas para gerar anticorpos humanos de alta afinidade ou fragmentos de ligação ao antígeno desses.

[0174] Em alguns aspectos, um anticorpo monoclonal anti-HER3 pode ser um anticorpo humanizado. Métodos para engenheirar, humanizar ou reconstruir anticorpos não humanos ou humanos também

podem ser usados e são bem conhecidos na técnica. Um anticorpo humanizado, reconstruído ou similarmente engenheirado pode ter um ou mais resíduos de aminoácido de uma fonte que é não humana, *por exemplo*, mas sem se limitar a, camundongo, rato, coelho, primata não humano ou outro mamífero. Esses resíduos de aminoácido não humanos são substituídos por resíduos que são geralmente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente obtidos de uma variável de "importação", constante ou outro domínio de uma sequência humana conhecida. Essas sequências importadas podem ser usadas para reduzir a imunogenicidade ou reduzir, aumentar ou modificar a ligação, afinidade, constante nominal, constante extranominal, avidez, especificidade, meia-vida, ou qualquer outra característica adequada, como conhecido na técnica. Em geral, os resíduos CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência de ligação a HER3. Consequentemente, parte ou todas as sequências CDR não humanas ou humanas são mantidas enquanto as sequências não humanas das regiões variáveis e constantes podem ser substituídas por aminoácidos humanos ou outros.

[0175] Os anticorpos também podem ser opcionalmente anticorpos humanizados, reconstruídos, engenheirados ou engenheirados humanos com retenção de alta afinidade para o antígeno HER3 e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir esse objetivo, os anticorpos anti-HER3 humanizados (ou humanos) ou anticorpos engenheirados e reconstruídos podem ser opcionalmente preparados por um processo de análise das sequências originais e vários produtos humanizados e engenheirados conceituais utilizando modelos tridimensionais das sequências originais, engenheiradas, e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais estão comumente disponíveis e são comuns àqueles elementos versados na técnica. Os programas de computador estão disponíveis para ilustrar e exibir

estruturas conformacionais tridimensional prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise da função provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, *isto é*, a análise de resíduos que influenciam a capacidade de a imunoglobulina candidata ligar seu antígeno, como HER3. Desse modo, resíduos de estrutura (FW) podem ser selecionados e combinados a partir das sequências consenso e de importação de modo que a característica de anticorpo desejada, como afinidade aumentada para o(s) antígeno(s) alvo, seja obtida.

[0176] A humanização, reconstrução ou engenharia de anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses da presente invenção pode ser realizada utilizando qualquer método conhecido, como, mas sem se limitar àqueles descritos em, Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239:1534 (1988), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), Patente Nos. U.S. 5.639.641, 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567, 7.557.189; 7.538.195; e 7.342.110; Pedido Internacional Nos. PCT/US98/16280; PCT/US96/18978; PCT/US91/09630; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB89/01334; PCT/GB91/01134; Publicação de Pedido de Patente Internacional PCT/GB92/01755; Nos. WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; e Publicação de Patente europeia No. EP 229246; cada uma está aqui totalmente incorporada a título de referência, inclusive as referências citadas nessas.

[0177] Os anticorpos humanizados anti-HER3 e fragmentos de ligação ao antígeno desses também podem ser feitos em camundongos

transgênicos contendo locais de imunoglobulina humana que mediante a imunização são capazes de produzir o repertorio total de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Essa abordagem é descrita na Patente Nos. U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016.

[0178] Em alguns aspectos, proporciona-se um fragmento de anticorpo anti-HER3. Várias técnicas são conhecidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, esses fragmentos são derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (por exemplo, Morimoto *et al.*, 1993, *Journal of Biochemical e Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan *et al.*, 1985, *Science*, 229:81). Em alguns aspectos, os fragmentos de anticorpo anti-HER3 são produzidos de maneira recombinante. Os fragmentos de anticorpo Fab, Fv, e scFv também podem ser todos expressos e secretados a partir de *E. coli* ou outras células hospedeiras, permitindo assim a produção de grandes quantidades desses fragmentos. Esses fragmentos de anticorpo anti-HER3 também podem ser isolados das bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Os fragmentos de anticorpo anti-HER3 também podem ser anticorpos lineares como descrito na Patente No. U.S. 5.641.870. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o elemento versado na técnica.

[0179] De acordo com a presente invenção, as técnicas podem ser adaptadas para a produção de anticorpos de cadeia simples específicos para HER3 (veja, *por exemplo*, a Patente No. U.S. 4.946.778). Ademais, os métodos podem ser adaptados para a construção de bibliotecas de expressão Fab (veja, *por exemplo*, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989)) para permitir uma identificação rápida e eficaz de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada para HER3, ou derivados, fragmentos, análogos ou homólogos desses. Os fragmentos de anticorpo podem ser produzidos por técnicas que incluem, mas sem

se limitarem a: (a) um fragmento F(ab')2 produzido por digestão de pepsina de uma molécula de anticorpo; (b) um fragmento Fab gerado ao reduzir as pontes de dissulfeto de um fragmento F(ab')2, (c) um fragmento Fab gerado pelo tratamento da molécula de anticorpo com papaína e um agente redutor, e (d) fragmentos Fv.

[0180] Pode ser adicionalmente desejado, especialmente no caso de fragmentos de anticorpo, modificar um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse para aumentar sua meia-vida no soro. Isso pode ser obtido, por exemplo, mediante a incorporação de um epítopo de ligação de receptor no anticorpo ou fragmento de anticorpo por mutação da região apropriada no anticorpo ou fragmento de anticorpo ou ao incorporar o epítopo em um marcador de peptídeo que é então fundido com o anticorpo ou fragmento de anticorpo na extremidade ou no meio (*por exemplo*, por síntese de DNA ou peptídeo), ou por mutação de YTE. Outros métodos para aumentar a meia-vida no soro de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse, *por exemplo*, conjugação com uma molécula heteróloga como PEG são conhecidos na técnica.

[0181] Os anticorpos anti-HER3 heteroconjugados e fragmentos de ligação ao antígeno desses também estão dentro do escopo da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos covalentemente ligados. Esses anticorpos foram, por exemplo, propostos para marcar células imunes em células indesejadas (veja, *por exemplo*, Patente No. U.S. 4.676.980). É contemplado que os anticorpos anti-HER3 heteroconjugados e fragmentos de ligação ao antígeno desses podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química de proteína sintética, inclusive aqueles que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas utilizando uma reação de troca de dissulfeto ou ao formar uma ligação de tioéter. Exemplos de reagentes adequados para

esse propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

[0182] Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses podem ser combinadas com outros agentes terapêuticos ou conjugadas com outros agentes terapêuticos ou toxinas para formar imunoconjugados e/ou proteínas de fusão. Exemplos desses agentes terapêuticos e toxinas incluem, mas sem se limitarem a, cetuximab (Erbitux®), panitumumab (Vectibix®), lapatinib (Tykerb®/Tyverb®), e paclitaxel (Taxol®, Abraxane®) e derivados (*por exemplo*, docetaxel).

[0183] Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses podem ser conjugadas com anticorpos ou fragmentos de anticorpo que marcam o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Em outros aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser conjugadas com inibidores de tirosina quinase. Em alguns aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser conjugadas com inibidores da atividade tirosina quinase associada a EGFR e/ou HER2/neu. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser conjugadas com agentes antimitóticos. Em alguns aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser conjugadas com agentes que estabilizam a montagem de microtúbulo de fuso mitótico.

[0184] Para os propósitos da presente invenção, deve ser avaliado que os anticorpos anti-HER3 modificados ou fragmentos de ligação ao antígeno desses podem compreender qualquer tipo de região variável que proporcione a associação do anticorpo ou polipeptídeo a HER3. Nesse aspecto, a região variável pode compreender ou ser derivada de qualquer tipo de mamífero que possa ser induzido a estabelecer uma resposta humoral e gerar imunoglobulinas contra o antígeno associado

ao tumor desejado. Como isso, a região variável dos anticorpos anti-HER3 modificados ou fragmentos de ligação ao antígeno desses pode ser, por exemplo, de humano, murino, primata não humano (*por exemplo*, macacos-carangueeiros, macacos etc.) ou origem selvagem. Em alguns aspectos, as regiões variáveis e constantes dos anticorpos anti-HER3 modificados ou fragmentos de ligação ao antígeno desses são humanas. Em outros aspectos, as regiões variáveis de anticorpos compatíveis (geralmente derivados de uma origem não humana) podem ser engenheiradas ou especificamente personalizadas para aprimorar as propriedades de ligação ou reduzir a imunogenicidade da molécula. Nesse aspecto, as regiões variáveis úteis na presente invenção podem ser humanizadas ou de outro modo alteradas através da inclusão de sequências de aminoácido importadas.

[0185] Em alguns aspectos, os domínios variáveis em ambas as cadeias pesadas e leves de um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse são alteradas por pelo menos uma substituição parcial de uma ou mais CDRs e, se necessário, por substituição de região de estrutura parcial e alteração de sequência. Embora as CDRs possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe ou ainda subclasse que o anticorpo a partir do qual as regiões de estrutura são derivadas, contempla-se que as CDRs serão derivadas de um anticorpo de classe diferente e em alguns aspectos de um anticorpo de uma espécie diferente. Não é necessário substituir todas as CDRs pelas CDRs completas da região variável doadora para transferir a capacidade de ligação ao antígeno de um domínio variável para outro. Em vez disso, é necessário apenas transferir esses resíduos que são necessários para manter a atividade do sítio de ligação ao antígeno. Dadas as explicações apresentadas na Patente Nos. U.S. 5.585.089, 5.693.761 e 5.693.762, estará dentro da competência dos elementos versados na técnica realizar a experimentação rotineira ou teste por

tentativa e erro para obter um anticorpo funcional com imunogenicidade reduzida.

[0186] Apesar das alterações na região variável, os elementos versados na técnica irão avaliar que os anticorpos anti-HER3 modificados ou fragmentos de ligação ao antígeno desses da invenção irão compreender anticorpos (*por exemplo*, anticorpos de comprimento total ou fragmentos imunorreativos desses) em que pelo menos uma fração de um ou mais domínios de região constante foi deletada ou de outro modo alterada para fornecer as características bioquímicas desejadas como localização de tumor aumentada ou meia-vida no soro reduzida quando comparado com um anticorpo de aproximadamente a mesma imunogenicidade que compreende uma região constante nativa ou inalterada. Em alguns aspectos, a região constante dos anticorpos modificados irão compreender uma região constante humana. Modificações na região constante compatíveis com essa invenção compreendem adições, deleções ou substituições de um ou mais aminoácidos em um ou mais domínios. Isto é, os anticorpos modificados descritos aqui podem compreender alterações ou modificações em um ou mais entre três domínios constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) e/ou no domínio constante de cadeia leve (CL). Em alguns aspectos, as regiões constantes modificadas em que um ou mais domínios são parcial ou totalmente deletados são contempladas. Em alguns aspectos, os anticorpos modificados irão compreender construções deletadas de domínio ou variantes em que todo o domínio CH2 foi removido (construções ΔCH2). Em alguns aspectos, o domínio de região constante omitido será substituído por um espaçador de aminoácido curto (*por exemplo*, 10 resíduos) que fornece alguma flexibilidade molecular tipicamente conferida pela região constante ausente.

[0187] Além de sua configuração, é conhecido na técnica que a

região constante media várias funções efetoras. Por exemplo, a ligação do componente C1 de complemento a anticorpos ativa o sistema complemento. A ativação de complemento é importante na opsonização e lise de patógenos celulares. A ativação de complemento também estimula a resposta inflamatória e também pode estar envolvida em hipersensibilidade autoimune. Ademais, os anticorpos se ligam às células através da região Fc, com um sítio de receptor Fc na região Fc de anticorpo que se liga a um receptor Fc (FcR) em uma célula. Há inúmeros receptores Fc que são específicos para diferentes classes de anticorpo, inclusive IgG (receptores gama), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). A ligação de anticorpo a receptores Fc em superfícies celulares ativa inúmeras respostas biológicas importantes e diversas que incluem engolfamento e destruição de partículas revestidas com anticorpo, depuração de complexos imunes, lise de células alvo revestidas com anticorpo por células assassinas (denominada citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo, ou ADCC), liberação de mediadores inflamatórios, transferência de placenta e controle de produção de imunoglobulina.

[0188] Em alguns aspectos, um anticorpo anti-HER3 ou um fragmento de ligação ao antígeno desse proporciona funções efetoras alteradas que, por sua vez, afetam o perfil biológico do anticorpo administrado ou fragmento de ligação ao antígeno desse. Por exemplo, a deleção ou inativação (através de mutações pontuais ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação de receptor Fc do anticorpo modificado de circulação aumentando assim a localização de tumor. Em outros casos, pode ser que as modificações de região constante, compatíveis com essa invenção, moderem a ligação de complemento e, assim, reduzam a meia-vida no soro e associação não específica de uma citotoxina conjugada. Ainda outras

modificações da região constante podem ser usadas para eliminar as ligações de dissulfeto ou porções de oligossacarídeo permitindo a localização aumentada devido à especificidade de antígeno ou flexibilidade de anticorpo aumentada. Similarmente, modificações na região constante de acordo com essa invenção podem ser facilmente feitas utilizando técnicas de engenharia bioquímica ou molecular bem conhecidas dentro do alcance do elemento versado na técnica.

[0189] Em alguns aspectos, uma molécula de ligação a HER3 que é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse não possui uma ou mais funções efetoras. Por exemplo, em alguns aspectos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse não possui atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou atividade de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Em alguns aspectos, o anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse não se liga a um receptor Fc e/ou fatores de complemento. Em alguns aspectos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse não possui função efetora.

[0190] Será observado que em alguns aspectos, os anticorpos modificados anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses podem ser engenheirados para fundir o domínio CH3 diretamente com a região de dobradiça dos respectivos anticorpos modificados ou fragmentos desses. Em outras construções, pode ser desejado fornecer um espaçador de peptídeo entre a região de dobradiça e os domínios CH2 e/ou CH3 modificados. Por exemplo, construções compatíveis poderiam ser expressas em que o domínio CH2 foi deletado e o domínio CH3 restante (modificado ou não modificado) é ligado à região de dobradiça com um espaçador de 5 a 20 aminoácidos. Esse espaçador pode ser adicionado, por exemplo, para garantir que os elementos reguladores do domínio constante permaneçam livres e acessíveis ou que a região de dobradiça permaneça flexível. Entretanto, deve ser

observado que os espaçadores de aminoácido podem, em alguns casos, se revelar imunogênicos e obter uma resposta imune indesejada contra a construção. Consequentemente, em alguns aspectos, qualquer espaçador adicionado à construção será relativamente não imunogênico, ou ainda omitido, para manter as qualidades bioquímicas desejadas dos anticorpos modificados.

[0191] Além da deleção de domínios de região constante totais, será avaliado que os anticorpos anti-HER3 e fragmentos de ligação ao antígeno desses da presente invenção podem ser fornecidos pela deleção parcial ou substituição de um ou mais ou ainda um único aminoácido. Por exemplo, a mutação de um único aminoácido em áreas selecionadas do domínio CH2 pode ser suficiente para reduzir substancialmente a ligação de Fc e, assim, aumentar a localização de tumor. Similarmente, pode ser desejado simplesmente deletar essa parte de um ou mais domínios de região constante que controla a função efetora (*por exemplo*, ligação C1Q de complemento) que será modulada. Essas deleções parciais das regiões constantes podem aprimorar as características selecionadas do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno desse (*por exemplo*, meia-vida no soro) enquanto deixa outras funções desejadas associadas ao domínio de região constante em questão intactas. Ademais, como aludido acima, as regiões constantes dos anticorpos anti-HER3 descritos e fragmentos de ligação ao antígeno desses podem ser modificadas através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que aumenta o perfil da construção resultante. Nesse aspecto, é possível interromper a atividade fornecida por um sítio de ligação conservado (*por exemplo*, ligação Fc) enquanto mantém substancialmente a configuração e o perfil imunogênico do anticorpo modificado ou fragmento de ligação ao antígeno desse. Alguns aspectos podem compreender a adição de um ou mais aminoácidos à região constante para melhorar as

características desejadas como reduzir ou aumentar a função efetora ou fornecer mais ligação de citotoxina ou carboidrato. Nesses aspectos, pode ser desejado inserir ou replicar sequências específicas derivadas de domínios de região constante selecionados.

[0192] A presente invenção inclui ainda variantes e equivalentes que são substancialmente homólogos aos anticorpos anti-HER3 quiméricos, humanizados e humanos, ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, apresentados aqui. Esses podem conter, por exemplo, mutações de substituição conservativa, *isto é*, a substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos similares. Por exemplo, a substituição conservativa se refere à substituição de um aminoácido por outro dentro da mesma classe geral como, por exemplo, um aminoácido acídico por outro aminoácido acídico, um aminoácido básico por outro aminoácido básico ou um aminoácido neutro por outro aminoácido neutro. O que se pretende por uma substituição de aminoácido conservativa é bem conhecido na técnica.

[0193] Um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse pode ser adicionalmente modificado para conter porções químicas adicionais que normalmente não fazem parte da proteína. Essas porções derivatizadas podem aprimorar a solubilidade, a meia-vida biológica ou absorção da proteína. As porções também podem reduzir ou eliminar quaisquer efeitos coletários das proteínas e similares. Uma visão geral dessas porções pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

VI. Moléculas de Ligação a HER3 de Codificação de Polinucleotídeos

[0194] Em alguns aspectos, a invenção inclui polinucleotídeos que compreendem sequências de ácido nucleico que codificam um polipeptídeo que se liga especificamente a HER3 ou um fragmento de

ligação ao antígeno desse. Por exemplo, a invenção proporciona um polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-HER3 ou codifica um fragmento de ligação ao antígeno desse anticorpo. Os polinucleotídeos da invenção podem se encontrar sob a forma de RNA ou sob a forma de DNA. O DNA inclui cDNA, DNA genômico, e DNA sintético; e pode ser de cadeia dupla ou cadeia simples, e se for de cadeia simples essa pode ser a cadeia de codificação ou não codificação (anti-senso).

[0195] Em alguns aspectos, os polinucleotídeos são isolados. Em alguns aspectos, os polinucleotídeos são substancialmente puros. Em alguns aspectos, os polinucleotídeos compreendem a sequência de codificação do polipeptídeo maduro fundido no mesmo quadro de leitura com um polinucleotídeo que ajuda, por exemplo, na expressão e secreção de um polipeptídeo de uma célula hospedeira (*por exemplo*, uma sequência líder que funciona como uma sequência secretória para controlar o transporte de um polipeptídeo a partir da célula). O polipeptídeo que possui uma sequência líder é uma pré-proteína e pode ter a sequência líder clivada pela célula hospedeira para formar a forma madura do polipeptídeo. Os polinucleotídeos também podem codificar uma pré-proteína de ligação a HER3 que é a proteína madura mais 5' resíduos de aminoácido adicionais.

[0196] Em alguns aspectos, os polinucleotídeos compreendem a sequência de codificação do polipeptídeo de ligação a HER3 maduro, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou um fragmento de ligação ao antígeno desse fundido no mesmo quadro de leitura com uma sequência marcadora que permite, por exemplo, a purificação do polipeptídeo codificado. Por exemplo, a sequência marcadora pode ser um marcador hexa-histidina fornecido por um vetor pQE-9 para proporcionar a purificação do polipeptídeo maduro fundido com o marcador no caso de um hospedeiro bacteriano, ou a sequência

marcadora pode ser um marcador de hemaglutinina (HA) derivado da proteínas de hemaglutinina de influenza quando um hospedeiro mamífero (*por exemplo*, COS-7 células) for usado.

[0197] A presente invenção se refere ainda a variantes de polinucleotídeos descritos que codificam, por exemplo, fragmentos de ligação a HER3, análogos, e derivados das moléculas de ligação a HER3 da invenção.

[0198] As variantes de polinucleotídeo podem conter alterações nas regiões de codificação, regiões de não codificação, ou ambas. Em alguns aspectos, as variantes de polinucleotídeo contêm alterações que produzem substituições silenciosas, adições, ou deleções, porém não alteram as propriedades ou atividades do polipeptídeo codificado. Em alguns aspectos, as variantes de nucleotídeo são produzidas por substituições silenciosas devido à degeneração do código genético. As variantes de polinucleotídeo podem ser produzidas por uma variedade de motivos, *por exemplo*, para otimizar a expressão de códon de um hospedeiro particular (mudar os códons no mRNA humano para aqueles preferidos por um hospedeiro bacteriano como *E. coli*). Os vetores e células que compreendem os polinucleotídeos descritos aqui também são fornecidos.

[0199] Em alguns aspectos, uma sequência de DNA que codifica uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou um fragmento de ligação ao antígeno desse pode ser construída por síntese química utilizando um sintetizador de oligonucleotídeo. Esses oligonucleotídeos podem ser desenhados com base na sequência de aminoácido do polipeptídeo desejado e selecionar aqueles códons que são favorecidos na célula hospedeira em que o polipeptídeo recombinante de interesse será produzido. Métodos padrão podem ser aplicados para sintetizar uma sequência de polinucleotídeo isolada que codifica um polipeptídeo isolado de interesse. Por exemplo, uma

sequência de aminoácido completa pode ser usada para construir um gene retrotraduzido. Ademais, um oligômero de DNA contendo uma sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo isolado particular pode ser sintetizado. Por exemplo, vários oligonucleotídeos pequenos que codificam porções do polipeptídeo desejado podem ser sintetizados e então ligados. Os oligonucleotídeos individuais contêm tipicamente 5' ou 3' ressaltos para a montagem complementar.

[0200] Uma vez montadas (por síntese, mutagênese sitio dirigida ou outro método), as sequências de polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo isolado particular de interesse serão inseridas em um vetor de expressão e operativamente ligadas a uma sequência de controle de expressão apropriada para a expressão da proteína em um hospedeiro desejado. A montagem apropriada pode ser confirmada por sequenciamento de nucleotídeo, mapeamento de restrição, e expressão de um polipeptídeo biologicamente ativo em um hospedeiro adequado. Como é bem conhecido na técnica, para obter altos níveis de expressão de um gene transfetado em um hospedeiro, o gene deve ser operativamente ligado a sequências de controle de expressão transcripcional e traducional que são funcionais no hospedeiro de expressão selecionado.

[0201] Em alguns aspectos, os vetores de expressão recombinantes são usados para amplificar e expressar anticorpos anti-HER3 de codificação de DNA ou fragmentos de ligação ao antígeno desses. Os vetores de expressão recombinantes são construções de DNA replicáveis que possuem fragmentos de DNA sintéticos ou derivados de cDNA que codificam uma cadeia de polipeptídeo de um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse, operativamente ligada a elementos reguladores transcripcionais ou traducionais adequados derivados de genes de mamífero, microbiais, virais ou de insetos. Uma unidade transcripcional geralmente

compreende uma montagem de (1) um elemento ou elementos genéticos que possuem uma função reguladora role em expressão de gene, por exemplo, promotores ou acentuadores transcricionais, (2) uma sequência estrutural ou de codificação que é transcrita em mRNA e traduzida em proteína, e (3) sequências de iniciação e terminação de transcrição e tradução apropriadas, como descrito em detalhes abaixo. Esses elementos reguladores podem incluir uma sequência operadora para controlar a transcrição. A capacidade de se replicar em um hospedeiro, geralmente conferido por uma origem de replicação, e um gene de seleção para facilitar o reconhecimento de transformantes pode ser adicionalmente incorporada. As regiões de DNA são operativamente ligadas quando essas estiverem funcionalmente relacionadas umas às outras. Por exemplo, o DNA de um peptídeo de sinal (líder secretório) é operativamente ligado ao DNA de um polipeptídeo se esse for expresso como um precursor que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor é operativamente ligado a uma sequência de codificação se esse controlar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação a ribossomo é operativamente ligado a uma sequência de codificação se esse ficar posicionado para permitir a tradução. Os elementos estruturais destinados para uso em sistemas de expressão de levedura incluem uma sequência líder que permite a secreção extracelular de proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, quando a proteína recombinante for expressa sem uma sequência líder ou de transporte, essa pode incluir um resíduo de metionina N-terminal. Esse resíduo pode ser opcional e subsequentemente clivado a partir da proteína recombinante expressa para fornecer um produto final.

[0202] A seleção de sequência de controle de expressão e do vetor de expressão irá depender da seleção do hospedeiro. Uma grande variedade de combinações de hospedeiro/vetor de expressão pode ser empregada. Os vetores de expressão úteis para hospedeiros

eucarióticos incluem, por exemplo, vetores que compreendem sequências de controle de expressão de SV40, vírus do papiloma bovino, adenovírus e citomegalovírus. Os vetores de expressão úteis para hospedeiros bacterianos incluem plasmídeos bacterianos, como plasmídeos de *E. coli*, inclusive pCR 1, pBR322, pMB9 e seus derivados, plasmídeos de gama de hospedeiro maiores, como M13 e fagos de DNA de cadeia simples filamentosos.

[0203] As células hospedeiras adequadas para a expressão de uma molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse incluem células de procariotos, levedura, inseto ou eucarióticas maiores sob o controle de promotores apropriados. Os procariotos incluem organismos gram-negativos ou gram-positivos, por exemplo, *E. coli* ou bacilli. As células eucarióticas maiores incluem linhagens celulares estabelecidas de origem de mamífero como descrito abaixo. Sistemas de tradução isentos de células também poderiam ser empregados. Os vetores de clonagem e expressão apropriados para uso com hospedeiros celulares bacterianos, fúngicos, de levedura, e mamífero são descritos por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), cuja descrição relativa está aqui incorporada a título de referência. Informações adicionais referentes a métodos de produção de proteína, inclusive produção de anticorpo, podem ser encontradas, *por exemplo*, na Publicação de Patente No. U.S. 2008/0187954, Patente Nos. U.S. 6.413.746 e 6.660.501, e Publicação de Patente Internacional No. WO 04009823, cada uma está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0204] Vários sistemas de cultura de células de mamífero ou inseto também podem ser vantajosamente empregados para expressar moléculas recombinantes de ligação a HER3, *por exemplo*, anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses. A expressão

de proteínas recombinantes em células de mamíferos pode ser realizada, pois essas proteínas são geralmente corretamente dobradas, apropriadamente modificadas e completamente funcionais. Exemplos de linhagens de célula hospedeira de mamífero adequados incluem HEK-293 e HEK-293T, as linhagens COS-7 de células de rim de macaco, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), e outras linhagens celulares que incluem, por exemplo, células L, C127, 3T3, ovário de hamster chinês (CHO), NSO, linhagens celulares HeLa e BHK. Os vetores de expressão de mamíferos podem compreender elementos não transcritos como uma origem de replicação, um promotor adequado e acentuador ligado ao gene que será expresso, e outras sequências não transcritas de flanqueamento 5' ou 3', e sequências não traduzidas 5' ou 3', como sítios de ligação ao ribossomo necessários, um sítio de poliadenilação, sítios doadores e aceitadores de splice, e sequências de terminação transcracional. Sistemas de baculovírus para a produção de proteínas heterólogas de células de inseto são analisados por Luckow e Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

[0205] As moléculas de ligação a HER3, *por exemplo*, anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses produzidas por um hospedeiro transformado podem ser purificadas de acordo com qualquer método adequado. Esses métodos padrão incluem cromatografia (*por exemplo*, troca iônica, cromatografia em coluna por afinidade e tamanho), centrifugação, solubilidade e diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para purificação de proteínas. Marcadores de afinidade como hexahistidina, domínio de ligação de maltose, sequência capsidial de influenza e glutationa-S-transferase podem ser ligados à proteína para permitir a fácil purificação por passagem sobre uma coluna de afinidade apropriada. As proteínas isoladas também podem ser fisicamente caracterizadas utilizando essas técnicas como proteólise, ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios x.

[0206] Por exemplo, os sobrenadantes de sistemas que secretam a proteína recombinante em meio de cultura podem ser primeiramente concentrados utilizando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Após a etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz de purificação adequada. Alternativamente, uma resina de troca aniônica pode ser empregada, por exemplo, uma matriz ou substrato que possui grupos de dietilaminoetila (DEAE) pendentes. As matrizes podem ser acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos comumente empregados em purificação de proteína. Alternativamente, uma etapa de troca catiônica pode ser empregada. Trocadores de cátions adequados incluem várias matrizes insolúveis que compreendem grupos sulfopropila ou carboximetila. Por fim, uma ou mais etapas de cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC) que empregam meios RP-HPLC hidrofóbicos, *por exemplo*, gel de sílica com grupos metila pendentes ou outros grupos alifáticos, podem ser empregadas para purificar adicionalmente uma molécula de ligação a HER3. Algumas ou todas as etapas de purificação anteriores, em várias combinações, também podem ser empregadas para fornecer uma proteína recombinante homogênea.

[0207] Uma proteína de ligação a HER3 recombinante, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse produzida em cultura bacteriana pode ser isolada, por exemplo, por extração inicial de péletes de células, seguido por uma ou mais etapas de concentração, precipitação por sais (salting-out), troca iônica aquosa ou etapas de cromatografia por exclusão de tamanho. A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pode ser empregada para as etapas de purificação final. As células microbianas empregadas na expressão de uma proteína recombinante podem ser divididas por

qualquer método conveniente, inclusive ciclos de congelamento-descongelamento, sonicação, divisão mecânica, ou uso de agentes de lise celular.

[0208] Métodos conhecidos na técnica para purificar os anticorpos e outras proteínas também incluem, por exemplo, aqueles descritos na Publicação de Patente Nos. U.S. 2008/0312425, 2008/0177048, e 2009/0187005, cada uma está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0209] Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um polipeptídeo que não é um anticorpo. Uma variedade de métodos para identificar e produzir polipeptídeos sem anticorpo que se ligam com alta afinidade a um alvo de proteína são conhecidos na técnica. Veja, *por exemplo*, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse et al., Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008), e Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008), cada uma está aqui incorporado a título de referência em sua totalidade. Em alguns aspectos, a tecnologia de exibição de fago pode ser usada para identificar/produzir um polipeptídeo de ligação a HER3. Em alguns aspectos, o polipeptídeo compreende um arcabouço de proteína de um tipo selecionado a partir do grupo que consiste em proteína A, uma lipocalina, um domínio fibronectina, um domínio de repetição consenso de anquirina, e tioredoxina.

VI. Métodos de Tratamento Que Utilizam Anticorpos Anti-HER3 Terapêuticos

[0210] Os métodos da invenção se referem ao uso de moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos, que incluem fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, e derivados desses, para tratar pacientes que possuem uma doença associada à expressão de HER3 ou células que expressam HER3. Por "célula que expressa HER3" entende-se uma

célula que expressa HER3. Os métodos para detectar a expressão de HER3 em células são bem conhecidos na técnica e incluem, mas sem se limitarem a, técnicas de PCR, imunoistoquímica, citometria de fluxo, Western blot, ELISA, e similares.

[0211] Apesar de a seguinte discussão se referir a métodos de diagnóstico e tratamento de várias doenças e distúrbios com uma molécula de ligação a HER3 da invenção, os métodos descritos aqui também são aplicáveis a anticorpos anti-HER3, e aos fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, e derivados desses anticorpos anti-HER3 que mantêm as propriedades desejadas dos anticorpos anti-HER3 da invenção, *por exemplo*, capazes de se ligarem especificamente a HER3 e neutralizar a atividade de HER3. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 são anticorpos humanos ou humanizados que não mediam ADCC humano, ou são selecionados a partir de anticorpos anti-HER3 conhecidos que não mediam ADCC, ou são anticorpos anti-HER3 que são engenheirados de modo que esses não mediem ADCC. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal clone 16. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante YTE clone 16. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal P2B11. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 1A4. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 2C2. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 2F10. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 3E1. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal P2B11 engenheirado para prolongar a meia-vida no soro. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 1A4 engenheirado para prolongar a meia-vida no soro. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo

monoclonal 2C2 engenheirado para prolongar a meia-vida no soro. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 2F10 engenheirado para prolongar a meia-vida no soro. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo monoclonal 3E1 engenheirado para prolongar a meia-vida no soro. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante P2B11 YTE. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante 1A4 YTE. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante 2C2-YTE. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante 2F10 YTE. Em outros aspectos, a molécula de ligação a HER3 é um anticorpo mutante 3E1 YTE.

[0212] Em um aspecto, o tratamento inclui a aplicação ou administração de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado desse da presente invenção a um indivíduo ou paciente, ou aplicação ou administração da molécula de ligação anti-HER3 a um tecido ou linhagem celular isolada de um indivíduo ou paciente, onde o indivíduo ou paciente possui uma doença, um sintoma de uma doença, ou uma predisposição a uma doença. Em outro aspecto, o tratamento também é destinado para incluir a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado desse da presente invenção a um indivíduo ou paciente, ou aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação anti-HER3 a um tecido ou linhagem celular isolada de um indivíduo ou paciente, que possui uma doença, um sintoma de uma doença, ou uma predisposição a uma doença.

[0213] As moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos

ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados desses da presente invenção são úteis para o tratamento de vários cânceres. Em um aspecto, a invenção se refere a moléculas de ligação anti-HER, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados desses para uso como um medicamento, em particular para uso no tratamento ou profilaxia de câncer. Exemplos de câncer incluem, mas sem se limitarem a, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata, e câncer de mama.

[0214] De acordo com os métodos da presente invenção, pelo menos uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado desse como definido aqui é usada para promover uma resposta terapêutica positiva em relação a câncer. O termo "resposta terapêutica positiva" em relação ao tratamento de câncer se refere a uma melhora na doença em associação à atividade dessas moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados desses, e/ou uma melhora nos sintomas associados à doença. Assim, por exemplo, uma melhora na doença pode ser caracterizada como uma resposta completa. Por "resposta completa" entende-se uma ausência de doença clinicamente detectável com a normalização de qualquer resultado de teste anterior. Alternativamente, uma melhora na doença pode ser categorizada como uma resposta parcial. Uma "resposta terapêutica positiva" inclui uma redução ou inibição da progressão e/ou duração de câncer, a redução ou melhora da gravidade de câncer e/ou a melhora de um ou mais sintomas que resultam da administração de uma molécula de ligação anti-HER3 da invenção. Em aspectos específicos, esses termos se referem a um, dois ou três ou mais resultados após a administração de moléculas de

ligação anti-HER3 da invenção: (1) uma estabilização, redução ou eliminação da população de células cancerosas; (2) uma estabilização ou redução em crescimento de câncer; (3) um comprometimento na formação de câncer; (4) erradicação, remoção, ou controle de câncer regional e/ou metastático primário; (5) uma redução na mortalidade; (6) um aumento na sobrevivência livre de doença, livre de reincidência, livre de progressão e/ou sobrevivência, duração, ou taxa total; (7) um aumento na taxa de resposta, a durabilidade de resposta, ou número de pacientes que respondem ou estão em remissão; (8) uma redução na taxa de hospitalização, (9) uma redução em períodos de tempo de hospitalização, (10) o tamanho do câncer é mantido e não aumenta ou aumenta em menos de 10%, preferivelmente menos de 5%, preferivelmente menos de 4%, preferivelmente menos de 2%, e (12) um aumento no número de pacientes em remissão.

[0215] A resposta clínica pode ser avaliada utilizando técnicas de varredura como uma varredura de imagem de ressonância magnética (MRI), imagem radiográfica x, varredura tomográfica computadorizada (CT), citometria de fluxo ou análise de seleção de células ativada por fluorescência (FACS), histologia, aspectos macroscópicos, e química sanguínea, inclusive, mas sem se limitar a, alterações detectáveis por ELISA, RIA, cromatografia, e similares. Além dessas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo submetido à terapia com a molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado desse, pode experimentar o efeito benéfico de uma melhora nos sintomas associados à doença.

[0216] As moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados desses da invenção podem ser usadas em combinação com qualquer terapia conhecida para câncer, inclusive qualquer agente ou combinação de agentes que são conhecidos como úteis, ou que foram usados ou estão

atualmente em uso, para tratamento de câncer, *por exemplo*, câncer de colôn, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, e câncer de mama. O segundo agente ou combinação de agentes da formulação de combinação farmacêutica ou regime de dosagem possui preferivelmente atividades complementares ao anticorpo ou polipeptídeo da invenção de modo que essas não afetam adversamente umas às outras.

[0217] Os agentes anticâncer incluem fármacos usados para tratar malignidades, como crescimentos cancerosos. A terapia de fármaco pode ser usada individualmente, ou em combinação com outros tratamentos como cirurgia ou terapia de radiação. Várias classes de fármacos podem ser usadas em tratamento de câncer, dependendo da natureza do órgão envolvido. Por exemplo, cânceres de mama são comumente estimulados por estrogênios, e podem ser tratados com fármacos que inativam os hormônios sexuais. Similarmente, câncer de próstata pode ser tratado com fármacos que inativam androgênios, o hormônio sexual masculino. Os agentes anticâncer para uso em alguns métodos da presente invenção incluem, entre outros, anticorpos (*por exemplo*, anticorpos que se ligam a IGF-1R, anticorpos que se ligam a EGFR, anticorpos que se ligam a HER2, anticorpos que se ligam a HER3, ou anticorpos que se ligam a cMET), IGF1R de marcação de pequenas moléculas, EGFR de marcação de pequenas moléculas, HER2 de marcação de pequenas moléculas, antimetabólitos, agentes de alquilação, inibidores de topoisomerase, agentes de marcação de microtúbulo, inibidores de quinase, inibidores de síntese de proteína, agentes imunoterapêuticos, terapias hormonais, glucocorticoides, inibidores de aromatase, inibidores de mTOR, agentes quimioterápicos, inibidores de Proteína Quinase B, inibidores de Fosfatidilinositol 3-Quinase (PI3K), inibidores de Quinase Dependente de Ciclina (CDK), RLr9, CD289, inibidores de enzima, anti-TRAIL, inibidores de MEK, etc.

[0218] Em aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em combinação com anticorpos ou fragmentos de anticorpo que marcam o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), *por exemplo*, cetuximab (Erbitux®, Imclone), panitumumab (Vectibix®, Amgen), matuzumab/EMD72000 (Merck Serono), MM-151 oligoclonal (Merrimack), nimotuzumab (TheraCIM, InnGene Kalbiotechy), GA201/RG7160 (Roche), Sym004 (Sympheogen), MEHD-7945A (EGFR/HER3 dual específico, Genentech). Em outros aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em combinação com anticorpos ou fragmentos de anticorpo que marcam HER2, *por exemplo*, pertuzumab (rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech), trastuzumab (Herceptin®, Genentech/Roche), MM-111 (anticorpo HER2/HER3 biespecífico, Merrimack, por exemplo, WO 2009/126920). Ainda em outros aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em combinação com anticorpos ou fragmentos de anticorpo que também marcam HER3, *por exemplo*, MEHD-7945A/RG7597 (EGFR/HER3 dual específico, Genentech, por exemplo, WO 2010108127), MM-121 (Merrimack, por exemplo, WO 2008/100624), MM-111 (anticorpo HER2/HER3 biespecífico, Merrimack, por exemplo, WO 2009/126920), AV-203 (Aveo, por exemplo, WO 2011/136911), AMG888 (Amgen, WO 2007/077028), HER3-8 (Immunogen, por exemplo, WO 2012/019024). Em aspectos específicos adicionais, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em combinação com anticorpos ou fragmentos de anticorpo que marcam HER4. Em um

aspecto específico, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com um anticorpo que marca EGFR, ou HER2 (por exemplo, cetuximab ou trastuzumab). Em um aspecto específico adicional, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com conjugados de anticorpo e fármaco que marcam HER2 (por exemplo, trastuzumab emtansine, Genentech/Roche). É contemplado que as moléculas de ligação a HER3 da invenção aumentam a internalização e degradação de um co-receptor induzido pela ligação de um anticorpo ao co-receptor e irá então, aumentar a eficácia de um anticorpo e/ou conjugado de anticorpo e fármaco que marca EGFR, HER2 e/ou HER4.

[0219] Em outros aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com inibidores de tirosina quinase. Em alguns outros aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com inibidores da atividade tirosina quinase associados a EGFR e/ou HER2/neu, *por exemplo*, lapatinib. Em aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, podem ser administradas em combinação com inibidores de pequenas moléculas do(s) receptor(es) de fator de crescimento epidérmico (*por exemplo*, EGFR, HER2, HER4) *por exemplo*, gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); canertinib/CI-1033 (Pfizer); lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline), erlotinib (Tarceva®, OSI Pharma), afatinib (Tovok®/Tomtovok®, Boehringer Ingelheim), neratinib (HKI-272, Pfizer).

[0220] Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com agentes antimitóticos. Em alguns aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com agentes que estabilizam a montagem de microtúbulo de fuso mitótico, *por exemplo*, paclitaxel ou docetaxel.

[0221] Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em combinação com inibidores de MEK (proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), também conhecida como MAPKK), *por exemplo*, selumetinib (AZD6244, ARRY-142866, AstraZeneca), WX-554 (Wilex), trametinib (GlaxoSmithKline), refametinib (Ardea Biosciences), E-6201 (Eisai), MEK-162 (Novartis). Em um aspecto particular, a combinação de um inibidor de MEK e uma molécula de ligação a HER3 da invenção é mais eficaz do que o agente individualmente. Em um aspecto específico, uma molécula de ligação a HER3 da invenção é administrada e combinação com selumetinib.

[0222] Quando as terapias combinadas compreendem a administração de uma molécula de ligação anti-HER3 em combinação com a administração de outro agente terapêutico, os métodos da invenção incluem a coadministração, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e a administração consecutiva em cada ordem. Em alguns aspectos, os anticorpos anti-HER3 descritos aqui são administrados em combinação com outros fármacos, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado desse e o(s) agente(s) terapêutico(s) podem ser administrados sequencialmente, em cada ordem, ou simultaneamente (*isto é*, ao mesmo tempo ou dentro do mesmo quadro de tempo).

[0223] A terapia de combinação pode proporcionar "sinergia" e mostrar "sinérgico", *isto é*, o efeito obtido quando os ingredientes ativos usados em conjunto é maior do que a soma dos efeitos que resulta do uso dos compostos separadamente. Um efeito sinérgico pode ser obtido quando os ingredientes ativos forem: (1) co-formulados e administrados ou aplicados simultaneamente em uma formulação de dosagem unitária combinada; (2) aplicada por alternação ou em paralelo como formulações separadas; ou (3) por algum outro regime. Quando aplicados em terapia de alternação, um efeito sinérgico pode ser obtido

quando os compostos forem administrados ou aplicados sequencialmente, *por exemplo*, por injeções diferentes em seringas separadas. Em geral, durante a terapia de alternação, uma dosagem eficaz de cada ingrediente ativo é administrada sequencialmente, *isto é*, serialmente, enquanto em terapia de combinação, dosagens eficazes de dois ou mais ingredientes ativos são administradas em conjunto.

[0224] Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode ser administrada em uma combinação sinérgica com um inibidor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Em alguns aspectos, o inibidor EGFR é um anticorpo. Em aspectos específicos, o anticorpo inibidor de EGFR é Erbitux® (cetuximab) ou panitumumab (Vectibix®). Em aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em uma combinação sinérgica com inibidores da atividade tirosina quinase associados a EGFR e/ou HER2/neu, *por exemplo*, lapatinib. Em alguns aspectos, a molécula de ligação a HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno desse da invenção pode ser administrada em uma combinação sinérgica com um inibidor HER2. Em alguns aspectos, o inibidor HER2 é um anticorpo. Em aspectos específicos, o anticorpo inibidor HER2 é pertuzumab (rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech), trastuzumab (Herceptin®, Genentech/Roche) ou trastuzumab emtansine (Genentech/Roche). Em aspectos específicos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, podem ser administradas em uma combinação sinérgica com inibidores da atividade tirosina quinase associados a HER2/neu, *por exemplo*, lapatinib. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação a HER3 da invenção podem ser administradas em uma combinação sinérgica com

um agente antimitótico. Em alguns aspectos específicos, o agente antimitótico estabiliza a montagem de microtúbulo de fuso mitótico. Em alguns aspectos específicos, o agente antimitótico é paclitaxel ou docetaxel. Em algumas modalidades específicas, o anticorpo 2C2 pode ser administrado em uma combinação sinérgica com um inibidor de receptor de fator de crescimento (EGFR). Em algumas modalidades específicas, o inibidor EGFR é um anticorpo. Em modalidades específicas, o anticorpo inibidor de EGFR administrados sinergicamente com o anticorpo 2C2 é Erbitux® (cetuximab). Em modalidades específicas, o 2C2 anticorpo pode ser administrado em uma combinação sinérgica com inibidores da atividade tirosina quinase associados a EGFR e/ou HER2/neu, *por exemplo*, lapatinib. Em algumas modalidades, o anticorpo 2C2 pode ser administrado em uma combinação sinérgica com um agente antimitótico. Em algumas modalidades específicas, o agente antimitótico administrado sinergicamente com o anticorpo 2C2 estabiliza a montagem de microtúbulo de fuso mitótico. Em algumas modalidades específicas, o agente antimitótico administrado sinergicamente com o anticorpo 2C2 é paclitaxel.

[0225] Em um aspecto, o câncer compreende a mutação KRAS. Em aspectos específicos, a mutação KRAS fica localizado no códon 12 de um gene KRAS humano. Como demonstrado na seção de Exemplos, os anticorpos anti-HER3 descritos aqui são capazes de inibir o crescimento de células tumorais que compreendem uma mutação KRAS, quando usados como um único agente (monoterapia) ou em combinação com outro agente terapêutico.

[0226] Um aspecto adicional é o uso de moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados desses, para o monitoramento de diagnóstico de níveis de proteínas em tecido como parte de um procedimento de

teste clínico, *por exemplo*, para determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. Por exemplo, a detecção pode ser facilitada ao acoplar o anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequados incluem peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo protético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbelliferone, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H .

VII. Composições Farmacêuticas e Métodos de Administração

[0227] Os métodos de preparação e administração de moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dessas da invenção a um indivíduo em necessidade dessas são bem conhecidos ou são prontamente determinados por aqueles versados na técnica. A via de administração da molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa pode ser, por exemplo, oral, parenteral, por inalação ou tópica. O termo parenteral, conforme usado no presente documento, inclui, *por exemplo*, administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal. Entretanto, em outros métodos compatíveis com os ensinamentos no presente documento, as moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dessas, da

invenção podem ser diretamente aplicados ao sítio da população celular adversa aumentando, deste modo, a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[0228] Conforme discutido no presente documento, as moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dessas da invenção podem ser administrados em uma quantidade farmaceuticamente eficaz para o tratamento *in vivo* de doenças mediadas por células que expressam HER3, tais como, determinados tipos de cânceres.

[0229] As composições farmacêuticas usadas nesta invenção podem compreender veículos farmaceuticamente aceitáveis, que incluem, *por exemplo*, água, trocadores de íons, proteínas, substâncias tampão e sais. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão. As formulações adequadas para uso nos métodos terapêuticos descritos no presente documento são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16^a ed. (1980). Em alguns aspectos, as moléculas de ligação HER3 da invenção são formuladas em uma composição estável refrigerada (2-8°C). Em um aspecto particular, a composição estável refrigerada compreende 25 mM de histidina/histidina HCL, 205 mM de sacarose, 0,02% de polissorbato 80 a pH 6,0. Em outro aspecto particular, as moléculas de ligação HER3 da invenção são formuladas a 25-100 mg/ml na composição estável refrigerada.

[0230] Em qualquer caso, as soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se um composto ativo (*por exemplo*, um anticorpo anti-HER3, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado desse, por si mesmo ou em combinação com outros agentes ativos) na quantidade requerida em um solvente apropriado seguido pela esterilização por filtração. Ademais, as preparações podem ser

embaladas e vendidas na forma de um kit. Tais artigos de fabricação podem ter rótulos ou bulas que indicam que as composições associadas são úteis para o tratamento de um indivíduo que sofre de, ou predisposto a uma doença ou distúrbio.

[0231] As formulações parenterais podem ser uma dose única em bolus, uma infusão ou uma dose de carga em bolus seguida por uma dose de manutenção. Estas composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, *por exemplo*, uma vez ao dia, ou em uma base "conforme necessário".

[0232] A composição pode ser administrada como uma única dose, múltiplas doses ou ao longo de um período de tempo estabelecido em uma infusão. Os regimes de dosagem também podem ser ajustados para proporcionar a resposta desejada ótima (*por exemplo*, uma resposta terapêutica ou profilática).

[0233] As doses terapeuticamente eficazes das composições da presente invenção, para tratamento de doenças mediadas por células que expressam HER3, tais como, determinados tipos de cânceres, que incluem, *por exemplo*, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata e câncer de mama, variam dependendo de muitos fatores diferentes, que incluem meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é humano ou um animal, outras medicações administradas, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Geralmente, o paciente é um humano, porém, mamíferos não humanos que incluem mamíferos transgênicos também podem ser tratados. As dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos por aqueles versados na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

[0234] A quantidade de pelo menos uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de ligação, variante ou

derivado dessa a ser administrada é prontamente determinada por alguém de conhecimento comum na técnica sem dada experimentação indevida à descrição da presente invenção. Os fatores que influenciam o modo de administração e a respectiva quantidade de pelo menos uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa incluem, porém, não se limitam a, severidade da doença, histórico da doença, e a idade, altura, peso, saúde e condição física do indivíduo submetido à terapia. De maneira similar, a quantidade de molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo, ou fragmento, variante ou derivado dessa, a ser administrada será dependente do modo de administração e se o indivíduo será submetido a uma única dose ou múltiplas doses dessa agente.

[0235] A presente invenção também proporciona o uso de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa, na fabricação de um medicamento para tratar um tipo de câncer, que inclui, *por exemplo*, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata e câncer de mama.

[0236] A invenção também proporciona o uso de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo da invenção, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa, na fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo para tratar um tipo de câncer. Em determinados aspectos, o medicamento é usado em um indivíduo que foi pré-tratado com pelo menos outra terapia. "Pré-tratado" ou "pré-tratamento" se destina ao indivíduo que recebeu uma ou mais outras terapias (*por exemplo*, foi tratado com pelo menos outra terapia anticâncer) antes de receber o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo ou fragmento de

ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa. Não é necessário que o indivíduo responda ao pré-tratamento com a terapia ou terapias anteriores. Deste modo, o indivíduo que recebe o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa pode ter respondido, ou pode ter falhado em responder ao pré-tratamento com a terapia anterior, ou a uma ou mais das terapias anteriores onde o pré-tratamento compreendia múltiplas terapias.

[0237] A invenção também proporciona a coadministração de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo da invenção, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa e pelo menos uma outra terapia. O anticorpo anti-HER3 e pelo menos uma outra terapia podem ser coadministrados em conjunto em uma única composição ou podem ser coadministrados em conjunto ao mesmo tempo ou tempos de sobreposição em composições separadas.

[0238] A invenção também proporciona o uso de uma molécula de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpo da invenção, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado dessa, na fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo para tratar câncer, em que a molécula de ligação anti-HER3 é administrada antes que um indivíduo tenha sido tratado com pelo menos uma outra terapia.

VIII. Diagnósticos

[0239] A invenção proporciona adicionalmente um método de diagnóstico útil durante a diagnose de doenças mediadas por células que expressam HER3, tais como, determinados tipos de câncer que incluem, *por exemplo*, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata e câncer de mama, que envolve a medição do nível de expressão de proteína HER3 ou a transcrição no tecido ou outras células ou fluido corporal a partir de um

indivíduo e a comparação do nível de expressão medido com um nível de expressão HER3 padrão no tecido ou fluido corporal normal, de modo que um aumento no nível de expressão comparado ao padrão seja indicativo de um distúrbio.

[0240] Os anticorpos anti-HER3 da invenção e fragmentos de ligação ao antígeno, variantes e derivados desses, podem ser usados para analisar os níveis de proteína HER3 em uma amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos por aqueles versados na técnica (*por exemplo*, vide Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Outros métodos à base de anticorpos úteis para detectar a expressão de proteína HER3 incluem imunoensaios, tais como, o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunoprecipitação ou Western blotting. Os ensaios adequados são descritos em mais detalhes em outro lugar no presente documento.

[0241] "Analizar o nível de expressão de polipeptídeo HER3" se destina a medir ou estimar qualitativa ou quantitativamente o nível de polipeptídeo HER3 em uma primeira amostra biológica diretamente (*por exemplo*, ao determinar ou estimar o nível de proteína absoluto) ou relativamente (*por exemplo*, ao comparar ao nível de polipeptídeo associado à doença em uma segunda amostra biológica). O nível de expressão de polipeptídeo HER3 na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado a um nível de polipeptídeo HER3 padrão, sendo que o padrão é adotado a partir de uma segunda amostra biológica obtida a partir de um indivíduo que não tem o distúrbio ou que é determinado calculando-se a média dos níveis a partir de uma população de indivíduos que não tem o distúrbio. Conforme será avaliado na técnica, uma vez que o nível de polipeptídeo HER3 "padrão" é conhecido, este pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação.

[0242] A invenção proporciona adicionalmente a método de diagnóstico útil durante a diagnose de doenças mediadas por células que expressam HER3, tais como, determinados tipos de câncer, que incluem, *por exemplo*, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata e câncer de mama, que envolve a medição do nível de atividade de proteína HER3 no tecido ou outras células ou fluido corporal a partir de um indivíduo e a comparação do nível de atividade medido a um nível de atividade HER3 padrão em tecido ou fluido corporal normal, de modo que um aumento no nível de atividade comparado ao padrão seja indicativo de um distúrbio.

[0243] A invenção proporciona adicionalmente um método de diagnóstico útil durante o tratamento de doenças mediadas por células que expressam HER3, tais como, determinados tipos de câncer, que incluem, *por exemplo*, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, câncer pancreático, câncer de próstata e câncer de mama, que envolve a medição do nível de atividade da proteína HER3 no tecido ou outras células ou fluido corporal a partir de um indivíduo durante o tratamento de uma doença mediada por células que expressam HER3 e a comparação do nível de atividade medido a um nível de atividade HER3 padrão em tecido ou fluido corporal normal e/ou comparação do nível de atividade medida a um nível de atividade HER3 padrão no tecido ou fluido corporal obtido a partir do indivíduo antes do tratamento, de modo que uma redução no nível de atividade comparada ao padrão seja indicativa de uma inibição da atividade HER3.

[0244] "Analizar o nível de atividade da proteína HER3" se destina a medir ou estimar qualitativa ou quantitativamente a atividade da proteína HER3 em uma primeira amostra biológica diretamente (*por*

exemplo, ao determinar ou estimar o nível de atividade absoluto) ou relativamente (por exemplo, ao comparar ao nível de atividade em uma segunda amostra biológica). O nível de atividade de proteína HER3 na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado a uma atividade de proteína HER3 padrão, sendo que o padrão é adotado a partir de uma segunda amostra biológica obtida a partir de um indivíduo que não tem o distúrbio ou que é determinado calculando-se a média dos níveis a partir de uma população de indivíduos que não tem o distúrbio ou a partir de um indivíduo antes do tratamento. Conforme será avaliado na técnica, uma vez que o nível de atividade de proteína HER3 “padrão” é conhecido, este pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação. Em determinados aspectos, o nível de atividade de HER3 em uma amostra biológica é medido, estimado ou comparado detectando-se o HER3 fosforilado em uma amostra biológica. Em um aspecto específico, o nível de atividade de HER3 em uma amostra biológica é medido, estimado ou comparado detectando-se o HER3 fosforilado em uma biópsia de pele, em que a pele é estimulada com HRG antes ou após a biópsia.

[0245] "Amostra biológica" se destina a qualquer amostra biológica obtida a partir de um indivíduo, linha celular, cultura de tecidos, ou outra fonte de células que expressam potencialmente HER3. Os métodos para obtenção de biópsias de tecido e fluidos corporais de mamíferos são bem conhecidos na técnica.

[0246] Em alguns aspectos, a bioatividade de um inibidor de HER3 (por exemplo, anticorpo anti-HER3 da invenção e fragmentos de ligação ao antígeno, variantes e derivados desse) administrado a um indivíduo pode ser detectada usando um ensaio ex-vivo. Em aspectos particulares o ensaio ex-vivo comprehende detectar o nível de HER3 fosforilado em uma biópsia de pele, em que a pele é estimulada com HRG antes ou após a biópsia. Em um aspecto específico, as biópsias de pele

combinadas são tomadas a partir de um indivíduo em que foi administrado o inibidor de HER3. Em um aspecto específico, a HRG é injetada sob uma primeira área da pele e um tampão de controle é injetado sob uma segunda área da pele de um indivíduo administrado com o inibidor de HER3, em que após uma quantidade desejada de tempo (por exemplo, 10-60 minutos) uma biópsia é tomada a partir das primeira e segunda áreas da pele. Em um aspecto alternativo, uma primeira biópsia de pele é tratada com HRG e uma segunda biópsia de pele é tratada com um tampão de controle, em que as primeira e segunda biópsias são biópsias de pele combinadas tomadas a partir de um indivíduo em que foi administrado o inibidor de HER3. Em outro aspecto específico, o nível de HER3 fosforilado é detectado nas biópsias de pele. Em determinados aspectos, a diferença no nível de HER3 fosforilado entre a primeira (HRG tratada) e a segunda (tampão de controle tratado) é determinada. Em determinados aspectos, a biópsia de pele é homogeneizada e o nível de HER3 fosforilado é detectado por ELISA. Em ainda outros aspectos, os níveis de HER3 fosforilado nas biópsias de pele a partir de um indivíduo em que foi administrado o inibidor de HER3 são comparados aos níveis de HER3 fosforilado nas biópsias de pele a partir de um indivíduo de controle em que não foi administrado o inibidor de HER3, em que uma redução no nível de HER3 fosforilado nas biópsias de pele do indivíduo em que foi administrado o inibidor de HER3 é uma medida da bioatividade do inibidor de HER3. Em aspectos alternativos, os níveis de HER3 fosforilado nas biópsias de pele a partir de um indivíduo em que foi administrado o inibidor de HER3 são comparados aos níveis de HER3 fosforilado em biópsias de pele a partir do mesmo indivíduo tomado ante da administração do inibidor de HER3, em que uma redução no nível de HER3 fosforilado nas biópsias de pele do indivíduo após a administração do inibidor de HER3 é uma medida da bioatividade do

inibidor de HER3. Outros aspectos específicos dos métodos são detalhados na seção de Exemplos 5.15.

IX. Kits que compreendem moléculas de ligação HER3

[0247] A presente invenção proporciona kits que compreendem a molécula de ligação HER3, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno dessa da invenção descrita no presente documento e que podem ser usados para realizar os métodos descritos no presente documento. Em determinados aspectos, um kit compreende pelo menos um anticorpo anti-HER3 purificado ou um fragmento de ligação ao antígeno desse em um ou mais recipientes. Em alguns aspectos, os kits contêm todos os componentes necessários e/ou suficientes para realizar um ensaio de detecção, que inclui todos os controles, direções para realizar ensaios, e qualquer software necessário para análise e apresentação de resultados. Alguém versado na técnica irá reconhecer prontamente que a molécula de ligação HER3 descrita, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno dessa da presente invenção pode ser prontamente incorporada em um dos formatos de kit estabelecidos que são bem conhecidos na técnica.

X. Imunoensaios

[0248] As moléculas de ligação anti-HER3, *por exemplo*, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, variantes, ou derivados desses das moléculas da invenção podem ser analisadas para ligação imunoespecífica por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoensaios que podem ser usados incluem, porém, não se limitam a sistemas de ensaio competitivos e não competitivos que usam técnicas, tais como, Western blots, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunoenzimático), imunoensaios em “sanduíche”, ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de

complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A, para citar apenas alguns. Tais ensaios são rotineiros e bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Ausubel *et al.*, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1, que é incorporado a título de referência no presente documento em sua totalidade).

[0249] As moléculas de ligação HER3, *por exemplo*, anticorpos anti-HER3 ou fragmentos de ligação ao antígeno desses, variantes, ou derivados desses das moléculas da invenção, podem ser histológicamente empregadas, como em ensaios de imunofluorescência, microscopia imunoelétrônica ou não imunológicos, para detecção *in situ* de receptores HER3 ou variantes conservados ou fragmentos peptídicos desses. A detecção *in situ* pode ser realizada removendo-se uma espécie histológica a partir de um paciente, e aplicando nesse uma molécula de ligação HER3 marcada, *por exemplo*, um anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno dessa, variante ou derivado dessa, de preferência, aplicada sobrepondo-se a molécula de ligação HER3 marcada (*por exemplo*, e anticorpo ou fragmento) sobre uma amostra biológica. Através do uso de tal procedimento, é possível determinar não apenas a presença de HER3, ou variantes ou fragmentos peptídicos conservados, mas, também, sua distribuição no tecido examinado. Usando-se a presente invenção, aqueles com conhecimento comum irão perceber prontamente que qualquer um de uma ampla variedade de métodos histológicos (tais como, procedimentos de coloração) pode ser modificada a fim de obter tal detecção *in situ*.

[0250] A atividade de ligação de um dado lote de molécula de ligação HER3, *por exemplo*, anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno dessa, variante ou derivado dessa pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos. Aqueles

versados na técnica serão capazes de determinar as condições de ensaio operativas e ótimas para cada determinação empregando-se a experimentação de rotina.

[0251] Os métodos e reagentes adequados para determinação de características de ligação de uma molécula de ligação HER3 isolada, *por exemplo*, anticorpo anti-HER3 ou fragmento de ligação ao antígeno dessa, variante, ou um derivado alterado/mutante dessa, são conhecidos na técnica e/ou são comercialmente disponíveis. O equipamento e software projetados para tais análises cinéticas são comercialmente disponíveis (*por exemplo*, BIACore, BIAevaluation software, GE Healthcare; KinExa Software, Sapidyne Instruments).

[0252] A prática da presente invenção irá empregar, exceto onde indicado de outro modo, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, que se encontram dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são totalmente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I e II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* Patente U.S. número 4.683.195; Hames e Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames e Higgins, eds. (1984) Transcription e Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells e Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller e Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 e 155; Mayer e Walker, eds. (1987) Immunochemical

Methods In Cell e Molecular Biology (Academic Press, London); Weir e Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); e in Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley e Sons, Baltimore, Md.).

[0253] Os princípios gerais da engenharia de anticorpos são estabelecidos em Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2^a ed.; Oxford Univ. Press). Os princípios gerais da engenharia de proteína são estabelecidos em Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Os princípios gerais de anticorpos e ligação de anticorpo-hapteno são estabelecidos em: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); e Steward (1984) Antibodies, Their Structure e Function (Chapman e Hall, New York, N.Y.). De maneira adicional, os métodos padrão em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos são geralmente seguidos como em Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic e Clinical Immunology (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) e Mishell e Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman e Co., NY).

[0254] Os trabalhos de referência padrão que estabelecem os princípios gerais da imunologia incluem Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry e Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology

(4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular e Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann e Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook e Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow e Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach e Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

[0255] Todas as referências citadas acima, assim como, todas as referências citadas no presente documento, são incorporadas no presente documento a título de referência em suas totalidades.

[0256] Os exemplos a seguir são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

EXEMPLOS

[0257] Os aspectos da presente descrição podem ser adicionalmente definidos a título de referência para os seguintes exemplos não limitativos, que descrevem em detalhes a preparação de determinados anticorpos da presente descrição e métodos para o uso de anticorpos da presente descrição. Será aparente para aqueles versados na técnica que muitas modificações, tanto nos materiais como métodos, podem ser praticadas sem sair do escopo da presente descrição.

Exemplo 1. Métodos para Isolamento/Otimização de Anticorpos Monoclonais anti-HER3

1.1. Antígenos e Linhas celulares

[0258] Her1(ECD) recombinante humano/Fc quimérico, HER2(ECD) humano/Fc quimérico, HER3(ECD) humano/Fc quimérico e Her4(ECD)/Fc humanos foram todos adquiridos a partir de R&D Systems (Minneapolis, MN) e foram fundidos ao marcador de Histidina C-terminal 6X através de um peptídeo ligante. Camundongo

HER3(ECD) recombinante/Fc quimérico foi gerado internamente. As células de câncer de mama KPL-4 humanas foram cultivadas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS).

1.2. Seleção de Biblioteca de Ligantes HER3 – Identificação de Anticorpo Clone 16 (CL16)

[0259] Os HER3(ECD)/Fc não marcados e biotinilados foram usados como os alvos para a seleção de Ligantes HER3 a partir da Dyax's Fab 310 human Fab phage display library (Dyax, Cambridge, MA). Dois braços de movimentação foram realizados: movimentação capturada e movimentação em solução. Para a movimentação capturada, o fago de entrada foi incubado primeiro com IgG policlonal humana capturada em imunotubos através da Proteína A/G recombinante imobilizada e, então, selecionados com alvo não marcado capturado em imunotubos através da Proteína A/G recombinante imobilizada.

[0260] Na movimentação em solução, o fago de entrada foi permitido a incubar com IgG policlonal humana, grânulos magnéticos revestidos com estreptavidina com biotina arrefecida para desmarcação e, então, selecionados com alvo biotinilado com incubação subsequente com grânulos magnéticos revestidos com estreptavidina para capturar o fago ligado ao alvo. Após a remoção do fago não ligado lavando-se extensivamente com TPBS (1x PBS/0,1% de Tween-20), o fago ligado foi eluído com 100 mM de TEA (trietylamina). O fago eluído e o fago restante nos grânulos a partir da movimentação em solução foram subsequentemente amplificados, e submetidos a rodadas adicionais de seleção. Três rodadas de seleção foram realizadas para cada braço de seleção.

[0261] A porcentagem de fagos de ligação positivos variou de menos que 1% usando movimentação de captura até 68% usando três rodadas de movimentação em solução (**TABELA 3**).

TABELA 3: Triagem de Ligantes HER3.

Movimentação	Movimentação capturada	Segunda rodada de Movimentação em solução	Terceira rodada de Movimentação em solução
Clones totais verificados	380	285	475
Clones positivos	1	7	322
Taxa positiva (%)	<1	2	68

1.3. Triagem para Ligantes HER3 Humanos e de Camundongo por ELISA de fago

[0262] Os fagos enriquecidos a partir das segunda e terceira rodadas de seleção foram verificados por ELISA de fago para ligação HER3 humana e de camundongo. Placas de 96 poços de meia área foram revestidos com $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{l}$ por poço de diferentes抗ígenos diluídos em 1x PBS, pH 7,4 de um dia para o outro a 4°C . As placas revestidas foram bloqueadas com 3% (peso por volume) de leite sem gordura em TPBS por 1 hora a temperatura ambiente, e lavadas duas vezes com TPBS. As placas foram, então, incubadas por 1 h com sobrenadante de fago de um dia para o outro. Após lavagem dez vezes com TPBS, as placas foram incubadas com anticorpo anti-M13 conjugado por peroxidase de raiz forte (HRP) 1 hora, e lavadas dez vezes. As placas foram desenvolvidas com solução de substrato de tetrametilbenzidina peroxidase (TMB), as reações foram interrompidas com $0,18 \text{ M}$ de H_2SO_4 , e as placas foram lidas a 450 nm em um leitor de placa ELISA.

[0263] 29 ligantes positivos exclusivos foram identificados que foram submetidos à reação cruzada com HER3 murino (como uma fusão HER3-Fc). Nenhum dos ligantes identificados mostrou reatividade cruzada para HER2 ou Her4 (dados não mostrados).

1.4. Reformatação de Fabs em Anticorpos e Expressão IgG Totais

[0264] A cadeia leve variável de imunoglobulina (VL) e cadeia pesada variável (VH) a partir de clones de fago positivos foram geradas por PCR e inseridas em um vetor de expressão IgG1 humano contendo a região de constante de cadeia leve lambda e a região IgG1 CH1-junta-CH2-CH3. Para expressar anticorpos IgG1, as células 293-F de rim embrionário humano foram transientemente transfetadas com os vetores IgG reformatados usando reagente 293fectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os meios condicionados foram colhidos 10 dias após a transfeção, acumulados, e filtrados de modo estéril. As IgG1s foram purificadas usando grânulos de proteína A. As IgG1s eluídas finais foram dialisadas contra PBS, e as concentrações de IgG1 foram determinadas por ensaio de quantificação de proteínas.

[0265] O Clone 16 (CL16; SEQ ID NOs: 1 e 2, VL sequências de aminoácido VH, respectivamente) foi reformatado para IgG1 humana.

1.5. Determinação de Internalização de Clone 16 de Anticorpo (CL16) por Imunofluorescência

[0266] As células KPL-4 de câncer de mama humano foram marcadas com anticorpo de Clone 16 (CL16). A incubação das células com CL16 leva a um aumento na endocitose HER3, que impediu que o receptor formasse complexos de sinalização ativos com HER2 na superfície celular.

[0267] Os anticorpos CL16 fixados à superfície celular foram permitidos a internalizar através da incubação das células sob condições de crescimento por zero (não internalizados) ou 2,5 horas (internalizados) (**Figura 1**). Todas as células foram, então, fixadas com 3,7% de paraformaldeído, lavadas em PBS, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em PBS, e coloridas com 1 µg/ml de IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) antes da adição de meio de montagem antifade e exame de microscopia fluorescente. Descobriu-se

que o anticorpo CL16 internaliza em células KPL-4. No tempo zero as células KPL-4 mostraram coloração de superfície celular intensa (**Figura 1**, 0 hora, painel superior), após a incubação sob condições de crescimento por 2,5 horas a coloração de superfície celular foi diminuída e substituída por coloração pontual intracelular indicativa de internalização (**Figura 1**, 2,5 horas, painéis inferiores).

1.6. Construção de um Clone 16 Fab que Expressa Vetor de Fago

[0268] O DNA que codifica o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) do Clone 16 de anticorpo foi clonado em um vetor de expressão de fago à base de M13 modificado previamente descrito por Dall'Acqua *et al.* (Dall'Acqua *et al.*, 2005, *Métodos*. 36:43-60). Neste vetor modificado, um DNA região constante de lambda humano (λ) foi elaborado no lugar da cadeia leve kappa humano (κ). A expressão do fragmento Fab se encontra sob o controle do promotor LacZ e a secreção do fragmento Fab é permitido pelas sequências de sinal de fago P3 fundidas aos N-terminais tanto das cadeias VH como das cadeias VL do fragmento Fab. A clonagem foi realizada por mutagênese hibridização, conforme descrito por Kunkel (Kunkel, T. A., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 82:488-492) e Wu (Wu, H., 2003, *Métodos Mol. Biol.* 207:197-212).

[0269] Resumidamente, as regiões variáveis da IgG de clone 16 foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Através da hibridização seguida pela reação de polimerização de DNA, a região leve variável de clone 16 foi integrada no quadro à região constante lambda humano, e a região pesada variável foi clonada no quadro com a região constante de cadeia pesada humana 1 (CH1), respectivamente. O vetor de fago contendo o fragmento Fab de Clone 16 foi, então, desenvolvido em cepa de *Escherichia coli* CJ236 para produzir o DNA de fita simples (ssDNA) contendo uridina (U), conforme descrito por Wu e An (Wu, H. e An, LL., 2003, *Methods Mol.*

Biol.207:213-33). O ssDNA contendo uridina foi usado como o modelo para introduzir mutações projetadas para aprimorar a afinidade de ligação ao HER3.

1.7. Linhagem germinativa de Clone 16 (CL16)

[0270] A análise de sequência mostra que as estruturas VH do Clone 16 (CL16) compartilham 100% de identidade de sequência com o gene da linha germinativa VH 3-23 enquanto as estruturas VL diferem em 6 posições de seu gene da linha germinativa mais próximo 47*01. A mutagênese direta de sítio para alterar cada um e todos os aminoácidos que diferem do gene da linha germinativa 47*01 foi realizada. De maneira específica, mutações de seis pontos foram introduzidas nas regiões variáveis de cadeia leve da seguinte maneira: Y2S, E3V, S18R, M21I, H38Q e S50Y onde a primeira letra representa o código de aminoácidos de uma letra do Clone original 16, o número representa o número de resíduos de estrutura (de acordo com Kabat), e a segunda letra representa o código de aminoácidos de uma letra da sequência de linha germinativa. Vide sequências na **Figura 2A** e **Figura 2C**, que correspondem ao VL CL16 original e (GL) VL CL16 de linha germinativa, respectivamente. As variantes resultantes foram expressas como Fab e sua ligação à proteína recombinante HER3 foi determinada por ELISA.

[0271] Os resultados de ligação mostram que a mutação de aminoácido H38Q na estrutura 2 aprimorou a ligação através do Clone parental 16, conforme medido por ELISA. Em contrapartida, a mutação S49Y na mesma estrutura teve impacto negativo na ligação. Outras mutações de ponto não mostraram impacto na ligação HER3. O mutante de linha totalmente germinativa com todos os 6 aminoácidos de linha não germinativa mutados mostrou um grau similar de ligação reduzida como a mutação de ponto S50Y, que indica que o aminoácido S50 participa da ligação. O teste adicional do clone com todas as

mutações de ponto de linha germinativa exceto ligação S50Y retida e/ou aumentada ao HER3 comparado ao clone parental 16. Este clone de linha parcialmente germinativa, Clone 16 (GL) (também referido aqui como “GL-P6”), foi usado como o modelo para a otimização de afinidade adicional.

1.8. Otimização de afinidade de Clone 16 (CL16)

[0272] Cada aminoácido de todas as 6 regiões de determinação complementar (CDRs) do clone GL-P6 germinativa foi individualmente mutado para outros 20 aminoácidos usando um método de mutagênese hibridização (Kunkel, 1985). Dois conjuntos de iniciadores de DNA, um contendo um códon NSS que codifica 8 aminoácidos e o outro contendo um códon NWS que codifica 12 aminoácidos diferentes, foram usados para introduzir mutações em cada posição CDR alvo. Os iniciadores degenerados individuais foram usados nas reações de mutagênese hibridização. Resumidamente, cada iniciador degenerado foi fosforilado, então, usado em uma razão 10:1 com o GL-16 Fab ssDNA uridinilado. A mistura foi aquecida a 95°C, então, resfriada a 55°C por 1 hora. Posteriormente, a ligase T4 e polimerase DNA T7 foram adicionadas e a mistura foi incubada por 1,5 horas a 37°C. Os produtos de síntese para VH e VL CDRs foram respectivamente acumulados; entretanto, as bibliotecas NSS e NWS foram mantidas separadas e independentemente verificadas. De maneira típica, 1 µL do DNA de biblioteca acumulado foi eletroporado em XL1-Blue para formação de placa no tecido bacteriano XL1-Blue ou para produção de fragmentos Fab (Wu e An, 2003).

1.9. Triagem Primária da Biblioteca Fab

[0273] A triagem primária consistiu em um ensaio ELISA (SPE) de único ponto que foi realizado usando sobrenadante de cultura de bactérias cultivadas em placas de 96 poços (poço profundo) e infectadas com clones M13 recombinantes individuais, conforme

descrito em outro lugar (Wu e An, 2003). Resumidamente, essa ELISA de captura envolveu o revestimento de poços individuais de uma Maxisorp Immunoplate de 96 poços com aproximadamente 50 ng de um anticorpo Fd anti-humano de ovelha (Biodesign International, ME) em um tampão de carbonato a pH 8,5 de um dia para o outro a 4°C. O próximo dia, a placa foi bloqueada com 3% de BSA em tampão de PBS por 1 h a temperatura ambiente. O sobrenadante Fab foi, então, adicionado à placa e incubado a temperatura ambiente por 1 h. Após a lavagem, 0,1 µg de proteína HER3 biotinilada foi adicionada ao poço e a mistura foi incubada por 1,5 h a temperatura ambiente. Essa foi seguida pela incubação com conjugado de peroxidase neutravidina-raiz-forte (HRP) (Pierce, IL) por aproximadamente 40 min. a temperatura ambiente. A atividade HRP foi detectada com substrato de tetra-metil-benzidina (TMB) e a reação arrefecida com 0,2 M de H₂SO₄. As placas foram lidas a 450 nm.

[0274] Os clones que exibem um sinal de densidade óptica (OD) a 450 nm maior que o clone parental GL-P6 Fab foram escolhidos e recrescidos (15 mL) (Wu e An, 2003) e reanalisados por ELISA (conforme descrito acima) em duplicata, para confirmar os resultados positivos. Os clones que exibiram repetidamente um sinal maior que o do GL-P6 Fab foram sequenciados. A concentração de proteína Fab de cada clone que teve uma alteração CDR foi, então, determinada por um ELISA Fab quantitativo, onde um Fab com concentração conhecida foi usado como uma referência. A concentração Fab foi determinada comparando-se os sinais ELISA com os sinais gerados pelo Fab de referência. O ensaio de ligação foi repetido uma vez mais para todas as variantes positivas sob concentrações Fab normalizadas a fim de determinar a afinidade de ligação relativa dos Fabs mutantes e do GL-P6 Fab parental.

[0275] O ELISA de ligação mostrou que duas variantes VH,

designaram o clone 14C7 e clone 15D12, que continham as mutações de ponto Y50I ou Y50V, respectivamente, em CDR2 exibiram aproximadamente um aprimoramento de 5 vezes na ligação HER3 sobre o clone GL-P6 parental de linha germinativa. Na campanha mutagênese VL, diversas mutações únicas em CDR1, *por exemplo*, clone 4H6 (que compreende a mutação de ponto S24R), clone 6E3 (que compreende a mutação de ponto S27L) ou em CDR3, *por exemplo*, clone 5H6 (que compreende a mutação de ponto S94G), clone 8A3 (que compreende a mutação de ponto S96aI), clone 4C4 (que compreende a mutação de ponto S96aR), clone 2B11 (que compreende a mutação de ponto S96aP) e clone 2D1 (que compreende a mutação V97A) que exibe a ligação aprimorada foram identificadas.

[0276] De maneira mais notável, a substituição de aminoácido S96a de VL-CDR3 com Isoleucina (I), Arginina (R) ou Prolina (P) resultaram em um aprimoramento de ligação de 3,5 vezes, 8,6 vezes e 32 vezes, respectivamente.

1.10. Triagem Combinatória da Biblioteca Fab

[0277] As mutações de ponto em VH e VL determinada a ser benéfica para ligação ao HER3 foram adicionalmente combinadas para ganhar sinergia de ligação adicional. Os mutantes combinatórios foram expressos como Fab e verificados usando o ELISA de ligação HER3. Embora a combinação de uma das mutações de ponto Y50I ou Y50V na cadeia VH do fragmento Fab com as mutações VL pareça não apresentar nenhum benefício, a ligação reduzida ao HER3, combina diversas ligações adicionalmente aprimoradas por mutações VL. Essa combinação de mutações VL inclui as combinações no clone 1A4 (que compreende as mutações de ponto L96P, S97P e V100A), clone 2C2 (que compreende as mutações de ponto S26L, L96P, S97P e V100A), clone 2F10 (que compreende as mutações S97P e V100A) e clone 3E1 (que compreende as mutações de ponto S23R, L96P, S97P e V100A).

1.11. Conversão das Variantes Fab otimizadas por Afinidade em Formato IgG e Expressão de Anticorpo

[0278] As variantes de mutante único e mutante de combinação que exibem ligação aprimorada foram convertidas em formato IgG para caracterização adicional. As regiões variáveis de cada variante foram amplificadas por PCR usando os iniciadores que codificaram os sítios de restrição para facilitar a clonagem em um vetor de expressão de IgG de mamíferos para expressão que usa células HEK 293F. As proteínas IgG1 humanas solúveis secretadas foram purificadas a partir do meio condicionado diretamente em colunas de proteína A 1 mL HiTrap (GE Healthcare, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras IgG1 humanas (tipicamente > 95% de homogeneidade, conforme julgadas por eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio-poliacrilamida) foram dialisadas contra PBS, congeladas instantaneamente, e armazenadas a -70°C.

[0279] A ligação das IgGs purificadas foi examinada usando um ELISA de ligação HER3. As IgGs mutantes de combinação mostraram ligação aprimorada, conforme determinado pelo sinal de ligação total, com 2C2 que mostra o aprimoramento de ligação mais significativo sobre o Clone parental 16 e outras variantes de mutante de combinação. As ligações da IgG ao HER3 de murino e cinomolgo também foram testadas por ELISA. Os resultados mostraram ligação aprimorada dos mutantes de combinação a essas espécies HER3 parálogas.

[0280] O alinhamento das sequências de aminoácido das regiões variáveis de cadeia leve e pesada para cada uma das mutações únicas identificadas é mostrado na **Figura 2A** e **Figura 2B**, respectivamente. A **TABELA 4** proporciona os SEQ ID NOs para cada clone. Um alinhamento das regiões variáveis de cadeia leve para cada um dos clones de combinação é proporcionado na **Figura 2C**.

TABELA 4

SEQ ID	DESCRIÇÃO	SEQ ID	DESCRIÇÃO
17	Clone 16 V _L aa	21	Clone 4H6 V _L CDR2 aa
1	Clone 16 de linha germinativa V _L aa	22	Clone 4H6 V _L CDR3 aa
2	Clone 16 V _H aa	7	Clone 6E.3 V _L aa
18	Clone 16 V _L CDR1 aa	19	Clone 6E.3 V _L CDR1 aa
21	Clone 16 V _L CDR2 aa	21	Clone 6E.3 V _L CDR2 aa
22	Clone 16 V _L CDR3 aa	22	Clone 6E.3 V _L CDR3 aa
31	Clone 16 V _H CDR1 aa	9	Clone 2D1 V _L aa
32	Clone 16 V _H CDR2 aa	18	Clone 2D1 V _L CDR1 aa
35	Clone 16 V _H CDR3 aa	21	Clone 2D1 V _L CDR2 aa
8	Clone 2B11 V _L aa	28	Clone 2D1 V _L CDR3 aa
18	Clone 2B11 V _L CDR1 aa	10	Clone 3A6 V _L aa
21	Clone 2B11 V _L CDR2 aa	18	Clone 3A6 V _L CDR1 aa
25	Clone 2B11 V _L CDR3 aa	21	Clone 3A6 V _L CDR2 aa
14	Clone 1A4 V _L aa	29	Clone 3A6 V _L CDR3 aa
18	Clone 1A4 V _L CDR1 aa	11	Clone 4C4 V _L aa
21	Clone 1A4 V _L CDR2 aa	18	Clone 4C4 V _L CDR1 aa
22	Clone 1A4 V _L CDR3 aa	21	Clone 4C4 V _L CDR2 aa
3	Clone 2C2 V _L aa	30	Clone 4C4 V _L CDR3 aa
19	Clone 2C2 V _L CDR1 aa	12	Clone 15D12.1 V _H aa
21	Clone 2C2 V _L CDR2 aa	31	Clone 15D12.1 V _H CDR1 aa

SEQ ID	DESCRIÇÃO	SEQ ID	DESCRIÇÃO
23	Clone 2C2 V _L CDR3 aa	33	Clone 15D12.1 V _H CDR2 aa
16	Clone 2F10 V _L aa	35	Clone 15D12.1 V _H CDR3 aa
18	Clone 2F10 V _L CDR1 aa	13	Clone 15D12.2 V _H aa
21	Clone 2F10 V _L CDR2 aa	31	Clone 15D12.2 V _H CDR1 aa
24	Clone 2F10 V _L CDR3 aa	34	Clone 15D12.2 V _H CDR2 aa
15	Clone 3E.1 V _L aa	35	Clone 15D12.2 V _H CDR3 aa
20	Clone 3E.1 V _L CDR1 aa	36	V _H FW1 aa
21	Clone 3E.1 V _L CDR2 aa	37	V _H FW2 aa
23	Clone 3E.1 V _L CDR3 aa	38	V _H FW3 aa
4	Clone 5H6 V _L aa	39	V _H FW4 aa
18	Clone 5H6 V _L CDR1 aa	40	V _L FW1 de linha germinativa aa
21	Clone 5H6 V _L CDR2 aa	41	V _L FW2 aa
26	Clone 5H6 V _L CDR3 aa	42	V _L FW3 aa
5	Clone 8A3 V _L aa	43	V _L FW4 aa
18	Clone 8A3 V _L CDR1 aa	44	V _L FW1 original aa
21	Clone 8A3 V _L CDR2 aa	45	Região constante IgG1*
27	Clone 8A3 V _L CDR3 aa	46	Região constante IgG1*-YTE
6	Clone 4H6 V _L aa	47	Clone 16 V _L nt
20	Clone 4H6 V _L CDR1 aa	48	Clone 16 V _H nt
* diferenças de alótipo são proporcionadas			

SEQ ID	DESCRÍÇÃO	SEQ ID	DESCRÍÇÃO
V _L aa consensus:	[FW ₁]X ₁ GSX ₂ SNIGLNYVS[FW ₂]RNNQRPS[FW ₃]AAWDDX ₃ X ₄ X ₅ GEX ₆ [FW ₄] em que [FW ₁], [FW ₂], [FW ₃] e [FW ₄] representam regiões de estrutura VL, em que (a) X ₁ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R) ou Serina (S), (b) X ₂ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Leucina (L), (c) X ₃ representa os resíduos de aminoácido Serina (S) ou Glicina (G), (d) X ₄ representa os resíduos de aminoácido Leucina (L) ou Prolina (P), (e) X ₅ representa os resíduos de aminoácido Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) ou Serina (S), e (f) X ₆ representa os resíduos de aminoácido Valina (V) ou Alanina (A).	V _H aa consensus:	[FW ₅]YYYMQ[FW ₆]X ₇ IGSSGGVTNYADSVKG[FW ₇]VGLGDAFDI[FW ₈] em que [FW ₅], [FW ₆], [FW ₇] e [FW ₈] representam regiões de estrutura VH, em que X ₇ representa os resíduos de aminoácido Tirosina (Y), Isoleucina (I) ou Valina (V)

1.12. Estudos de Ligação de Anticorpo Monoclonal Anti-HER3

[0281] As constantes de taxa cinética (k_{on} , k_{off}) e dissociação de equilíbrio (K_D) para a ligação das IgGs anti-HER3 ao domínio extracelular de proteína humana HER3 foram determinadas usando a tecnologia de ressonância de plasmon de superfície BIACore™ medindo-se a ligação de domínio extracelular HER3 humano (hu HER3(ECD)) à IgG capturada sobre uma superfície de chip de sensor. As constantes de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) individuais foram,

então, calculadas a partir das curvas de ligação resultantes usando o software BI_evaluation disponível através do fornecedor. Os dados foram ajustados em um modelo de ligação 1:1, que incluíram um termo para corrigir a ligação limitada por transporte de massa, devem ser detectados. A partir dessas constantes de taxa, a constante de ligação de dissociação aparente (K_D) para a interação de IgG com a proteína de domínio extracelular HER3 humana é, então calculada a partir do quociente de k_{off}/k_{on} .

[0282] A partir de gráficos BI_Acore de alta resolução, as constantes de taxa de associação e dissociação para a IgG parental de ligação, Clone16, ao domínio extracelular HER3 humano foram $5,29 \times 10^5 /Ms$ e $73,0 \times 10^{-4} /s$, respectivamente, produzindo uma K_D aparente de 14 nM. Em comparação, as constantes de taxa de associação para a ligação das variantes IgG aprimoradas por afinidade ao domínio extracelular HER3 humano foram similares àquelas medidas para a IgG parental, que variam de $3,41 \times 10^5$ a $4,32 \times 10^5 /Ms$. Estes mesmos gráficos também foram usados para determinar as constantes de taxa de dissociação correspondentes para as variantes de Clone 16, que variaram de $1,60 \times 10^{-4}$ a $6,21 \times 10^{-4} /s$. As K_D s aparentes para as variantes de Clone 16 foram calculadas, conforme descrito acima, e variaram de 0,429 nM (variante de clone 2C2) a 1,44 nM. (variante de clone P2B11). Os erros individuais para k_{on} e k_{off} foram baixos ($\leq \sim 2\%$ do parâmetro calculado), e os ajustes totais aos dados cinéticos indicaram que o uso do modelo de interação 1:1 foi apropriado. Também, a avaliação não indicou que a ligação foi limitada por transporte de massa.

[0283] A **TABELA 5** resume os atributos biofísicos dos clones monoclonais de combinação proporcionados na **Figura 2C**, incluindo os valores K_{on} , K_{off} e K_D , assim como os níveis e rendimentos de expressão.

[0284] O anticorpo monoclonal 2C2, que compreende 2C2 VL (SEQ ID NO: 3) e C16 VH original (SEQ ID NO: 2) foi o mais aprimorado por

afinidade que levou a uma K_D de 0,4 nM, que representa um aprimoramento de 32 vezes a partir do anticorpo monoclonal Clone 16 parental. O aprimoramento de K_D foi principalmente um resultado da dissociação reduzida. Os rendimentos de nível de expressão e produção também foram avaliados. Todos os clones de anticorpo monoclonal foram bem expressos em um estudo de transfecção transiente de 5 dias, com o anticorpo monoclonal 2C2 que mostra o nível de expressão mais alto neste estudo. Todas as derivações aprimoradas por afinidade mostraram extensões diferentes de aprimoramento de afinidade, porém, o anticorpo 1A4 desistiu devido à eficiência de expressão inferior.

TABELA 5: Resumo das propriedades biofísicas de diversas derivações aprimoradas por afinidade em comparação ao anticorpo parental CL16 (Clone 16).

Nome de clone	pl Calculado	Kon (1/MS) (xE+5)	Koff (1/s) (xE-4)	Biacore KD (nM, IgG down)	Biacore KD (nM, Her3 down)	Nível de expressão no dia 5 (translente)	Rendimento (mg/volume, ml)
P2B11	8,21	4,32	6,21	1,53 (9x)	0,74 (2.4x)	159 ug/ml	70/500
1A4	8,2	3,41	2,86	0,838 (17x)	0,493 (3,6x)	60 ug/ml	53/1200
2C2	8,2	3,41	1,60	0,434 (32x)	0,093 (19x)	148 ug/ml	71/600
2F10	8,2	3,54	2,90	0,818 (17x)	0,326 (5x)	130 ug/ml	66/600
3E1	8,32	3,43	1,78	0,52 (26x)	0,286 (6,2x)	125 ug/ml	59/600
Clone 16	7,83	5,29	73,0	14	1,77	ND	ND

Note: Cada derivação aprimorada por afinidade compreende a cadeia

VL de nome de clone e C16 VH original

[0285] Diversos ensaios à base de célula foram realizados para avaliar o aprimoramento funcional das derivações aprimoradas por afinidade através do clone 16 ao longo de modelos independentes de ligante (linha celular de câncer de mama humano BT-474, ATCC No. HTB-20TM) assim como dependentes de ligante (linha celular de câncer de mama humano T-47D, ATCC No. HTB-133) (ambas as linhas celulares obtidas a partir de ATCC), incluindo a inibição de via de sinalização HER3 (pHER3 e pAKT), supressão de crescimento celular (ensaio de crescimento de 6 dias de curto prazo e ensaio clonogênico de longo prazo), e anulação de pHER3 induzida por HRG em células T-47D (subcepa epitelial diferenciada T-47).

[0286] Ensaios clonogênicos foram realizados da seguinte maneira. As células BT-474 foram colocadas em placas a uma densidade de 1.000 células/poço em placas de 6 poços. Após a fixação de um dia para o outro, as células foram tratadas com IgG de controle de isótipo ou os anticorpos monoclonais HER3 indicados que seguem uma curva de dose de concentração. O meio com as doses apropriadas de anticorpos monoclonais foi renovado uma vez por semana por três semanas. No final do dia 21, as células foram processadas para o ensaio Cell-titer-Glo (CTG) para avaliar a inibição de formação de colônias através dos diversos anticorpos monoclonais (usando controle IgG como linha de base). Os valores IC₅₀ foram derivados da análise Prizm.

[0287] O ensaio de crescimento de seis dias BT-474 foi realizado basicamente conforme usado na **Figura 4** (vide Seção 2.2 no Exemplo 2, infra). O ensaio BT-474 pAKT foi realizado basicamente conforme usado na **Figura 10** (vide Seção 2.6.1 no Exemplo 2, infra). O ensaio pHER3 induzível por T-47D HRG foi realizado basicamente como usado na **Figura 3** (vide Seção 2.1 no Exemplo 2, infra), o ensaio de

ligação e internalização T-47D FACS foi realizado usando o mesmo protocolo usado para a **Figura 16A** (vide Seção 3.3.1 no Exemplo 3, infra).

[0288] Os valores IC₅₀ e níveis de inibição máximos foram compilados para propósitos de comparação. Conforme mostrado na **TABELA 6**, as derivações aprimoradas por afinidade exibiram uma potência 2-3 vezes aumentada consistente ao longo da maioria das análises. O Clone parental 16 e/ou um clone otimizado representativo, por exemplo, anticorpo de Clone 2C2 (também referido simplesmente como 2C2, ou anticorpo monoclonal 2C2) foi adicionalmente caracterizado em inúmeros ensaios *in vitro* e *in vivo*, conforme descrito abaixo.

[0289] Além disso, as mutações foram introduzidas na região Fc do clone otimizado 2C2 para prolongar a meia vida. De maneira específica, M252Y, S254T, T256E, numerados de acordo com o índice EU como em Kabat. Esta molécula otimizada de meia vida é referida como 2C2-YTE. Deve-se entender que outras mutações podem ser introduzidas, em vez de, ou em combinação com essas três, *vide, por exemplo*, patente U.S. número 7.083.784; publicação de pedido de patente Internacional número WO2009058492; Dall'Acqua *et al.*, 2002 J. Immunol. 169:5171-80; Zalevsky *et al.*, 2010, Nature Biotech. 28:157-9). 2C2-YTE foi mostrado para inibir a proliferação celular BT-474 e o crescimento da colônia na mesma extensão que 2C2 (dados não mostrados).

[0290] Uma composição estável refrigerada (2-8°C) foi obtida formulando-se os anticorpos (por exemplo, 50 mg/ml) em 25 mM de histidina/histina HCL, 205 mM de sacarose, 0,02% de polissorbato 80 a pH 6,0.

TABELA 6: Resumo das propriedades biológicas das derivações aprimoradas por afinidade em comparação com o anticorpo

monoclonal CL16 parental.

Nome de clone	Ensaio clonogênico BT474		Crescimento em 6 dias BT474		Ensaio BT474 pAKT		pHer3 induzível por T47D HRG		Ligação T47D FACS	
	IC50 (pm)	% de inibição Máx	Ponto de inflecção (pM)	% de inibição	Ponto de inflecção (pM)	% de inibição Máx	IC50 (pm)	% de inibição Máx	Kd (pM)	Max GMFI
P2B11	26,9	87,1	98	47,5	23,6	62	79,8	85	199	1441
1A4	30,7	81,3	133,3	54,5	28,5	62	133	84	281	1577
2C2	31,9	87,2	62,7	48,3	42,6	61	130,3	85	316	1583
2F10	31,2	80,4	66,7	49	46,4	62	127,2	86	306	1527
3E1	20,8	79,2	85,3	48,1	26,2	66	59,2	86	447	1644
Clone 16-PA	64,5	79,8	280	46	73,1	64	104,4	75	112	1055

Exemplo 2. Caracterização de Anticorpos Monoclonais anti-HER3

2.1. Ensaio de Fosforilação HER3 induzida por HRG (pHER3) em Células MCF-7

[0291] MCF-7 (ATCC No. HTB-22™) é uma linha celular de câncer de mama humano com expressão HER3, porém, sem expressão HRG endógena. As células MCF-7 foram colocadas em placas a uma densidade de 30,000 células/poço em uma placa de 96 poços e foram permitidas a se fixar de um dia para o outro. As células foram, então, privadas de soro por 24 horas antes do tratamento. Seguindo a privação de soro, o meio foi removido e substituído por meio livre de soro contendo anticorpos de teste e controle, e as células incubadas a 37°C por 1 hora. Os anticorpos de teste usados nesse exemplo, e nos exemplos adicionais proporcionados abaixo, incluem os anticorpos anti-HER3 proporcionados no presente documento, tais como, Clone 16, 2C2, 2C2-YTE; e anticorpos anti-HER3 conhecidos na técnica, em particular, U1-59 (Publicação de Patente Internacional WO 2007077028) e Ab#6 (Publicação de Patente WO 2008/100624)

designados no presente documento como, AMG e MM, respectivamente. Entretanto, o estoque de heregulina (HRG□1, R&D Systems, Minneapolis, MN) foi preparado a 4x (80ng/ml) em meio de crescimento livre de soro. No final do período de incubação de 1 hora, HRG□1 foi adicionada em poços (concentração final de 20ng/ml) e incubada a 37°C por 20 minutos. No final do tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. As células foram lisadas em 80□l Triton X tampão de lise (Boston Bioproducts, Ashland, MA) com inibidores de protease e fosfatase (Calbiochem, La Jolla, CA) e foram armazenadas a -20°C até a análise. pHER3 ELISA foi, então realizado seguindo o protocolo do fabricante (R&D Systems, DYC1769) usando placas ELISA de 96 poços de meio volume Corning® Costar® 3690 (Corning Life Science, Lowell, MA) e 50□l de lisado celular por poço.

[0292] A ativação HER3, refletida pela fosforilação HER3 (abreviada como pHER3), foi estimulada por células tratamento com HRG□1. O pré-tratamento com anti-HER3 2C2 mAb causou uma supressão dependente de dose do sinal pHER3 no ensaio pHER3 ELISA (**Figura 3**, top). Os anticorpos monoclonais anti-HER3 MM e AMG publicados também eram ativos nesse ensaio, entretanto, 2C2 era aproximadamente 5 vezes mais potente conforme determinado pelas medições IC₅₀ (**Figura 3**, inferior). Resultados similares foram observados para 2C2-YTE (dados não mostrados).

2.2. Supressão de crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-175

[0293] MDA-MB-175 (ATCC No. HTB-25™) é uma linha celular de câncer de mama que expressa HRG estabelecida (□-isoforma) que depende da via de sinalização HRG-HER3 para crescimento e sobrevivência. As células foram colocadas em placas a uma densidade de 2.000 células/poço em uma placa de paredes brancas de 96 poços e foram permitidas a se fixar de um dia para o outro. No dia seguinte, o

meio foi removido e substituído por 100 µl/poço meio de crescimento fresco completo contendo anticorpos de teste e controle. As placas, então, foram incubadas por um total de 6 dias. Para calcular o número de células relativo, CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI) foi usado de acordo com protocolo do fabricante. Após a adição CellTiter-Glo™, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e a luminescência foi medida usando um leitor de microplacas.

[0294] O ensaio de crescimento foi realizado com anticorpos monoclonais anti-HER3 2C2, MM, ou AMG. Conforme mostrado na Figura 4, todos os três anticorpos alcançaram o efeito anti-proliferação em diversas extensões, com 2C2 mostrando a potência mais alta ($IC_{50}=0,14\text{ }\mu\text{g/ml}$) (Figura 4, superior) e a supressão de crescimento mais alta (72%) (Figura 4, inferior).

2.3. Supressão de Crescimento de HMCB Células de Melanoma

[0295] HMCB (ATCC No. CRL-9607™) é um modelo de melanoma que expressa HRG estabelecido (1 α -isoforma) acionado pela heterodimerização HER2-HER3 induzida por HRG. As células HMCB foram colocadas em placas a uma densidade de 750 por poço em 100 µl de meio completo contendo 10% de FBS inativado por calor em placas de 96 poços (Costar®). No dia seguinte, os tratamentos de anticorpo foram preparadas em meio completo. A concentração inicial para todos os anticorpos monoclonais anti-HER3 e IgG de controle era de 10 µg/ml, e as diluições em série foram preparadas em meio completo. O meio de plaqueamento foi removido e os tratamentos foram adicionados em 100 µl por poço em triplicata.

[0296] As placas, então, foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por 6 dias. Volumes iguais de reagente CellTiter-Glo™ foram adicionados em cada poço. As placas foram agitadas em um agitador de placas por 10 minutos a temperatura ambiente para assegurar a lise celular completa. A luminescência foi medida usando um 2104

EnVision® Multilabel Reader (PerkinElmer, Waltham, MA).

[0297] Conforme mostrado na Figura 5, 2C2 foi novamente mais potente que os anticorpos existentes. 2C2 foi 8-30 vezes mais potente que os anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM publicados na inibição do crescimento celular da linha celular de melanoma HMBC.

2.4. Ensaios de Atividade HER3 eAKT em Células de Melanoma HMBC e Células A549 NSCLC

[0298] A capacidade de as derivações HER3 suprimirem a via de sinalização HER3 nos modelos HMBC (ATCC No. CRL-9607™) e A549 (ATCC No.CCL-185) HRG-autócrinos foi avaliada. As células HMBC foram colocadas em placas a 10^5 por poço em placas de 24 poços e em meio contendo 10% de FBS inativado por calor e permitidas a atingir uma confluência de 80% ou mais antes do tratamento de anticorpos. O meio de plaqueamento foi removido e as células foram submetidas à incubação com os anticorpos. Os anticorpos monoclonais anti-HER3 e uma IgG de controle foram preparados em meio completo. A concentração inicial para todos os anticorpos anti-HER3 foi de 10 μ g/ml e as diluições em série foram realizadas. A IgG de controle foi usada apenas em uma concentração de 10 μ g/ml. Os tratamentos foram aplicados seguindo a remoção de meio de plaqueamento. Após uma incubação de 6 horas (células HMBC) ou 72 horas (células A549) em 5% de CO₂ a 37°C, as células foram lavadas uma vez com PBS gelado e, então, lisadas adicionando-se tampão redutor Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA).

[0299] Após uma breve incubação, os lisados celulares foram coletados, quantidades iguais foram carregadas sobre géis Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) e as proteínas transferidas para as membranas PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó sem gordura e 0,1% de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) em TBS (pH 7,4) e incubadas

de um dia para o outro a 4°C com anticorpos para HER3 (anticorpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), pHER3 (anticorpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), AKT (anticorpo 9272, Cell Signaling, Technology, Beverly, MA), pAKT (anticorpo 4060, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anticorpo neuregulin-1/HRG (NRG1/HRG) (sc-348, Santa Cruz) e GAPDH (anticorpo G8795, Sigma, St. Louis, MO).

[0300] As membranas foram lavadas em 0,1% de Tween 20 em TBS e, então, incubadas por 1 hora em anticorpos secundários de estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz-forte (GE Healthcare). Após a lavagem, as bandas de proteína foram detectadas em filme de raios-X usando-se SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate e SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

[0301] Conforme mostrado nas **Figuras 6 e 7**, o anticorpo 2C2 anulou a via de sinalização HER3 tanto nas células HMBC como A549. 2C2 suprimiu suficientemente pHER3 e sua molécula efetora a jusante pAKT de uma maneira dose-dependente e foi mais potente que os anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG ou MM publicados em células HMBC. O anticorpo 2C2 também suprimiu pHER3 e sua molécula efetora a jusante pAKT em células A549.

2.5. Ensaio para Fosforilação HER3 (pHER3) em Modelos de Células para Câncer de Pulmão, Gástrico e de Mama

2.5.1. Ensaio de Células pHER3

[0302] As células (células HCC827 NSCLC, células HCC827 NSCLC resistentes a Gefitinib, células cancerosas gástricas MKN45, células cancerosas gástricas Kato III, ou células de câncer de mama amplificadas por BT-474 HER2) foram colocadas em placas a uma densidade de 30,000 células/poço em uma placa de 96 poços e foram permitidas a se fixar de um dia para o outro. As células, então, foram

tratadas com anticorpos de teste ou controle na curva de dose indicada a 37°C por 4 horas. No final do tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. As células foram lisadas em 80µl Triton X tampão de lise (Boston BioProducts, Ashland, MA) com inibidores de protease e fosfatase (Calbiochem, La Jolla, CA) e foram armazenadas a -20°C até a análise. O pHER3 ELISA foi, então, realizado seguindo o protocolo do fabricante (R&D Systems, DYC1769, Minneapolis, MN) usando placas ELISA de 96 poços de meio volume (Costar 3690) e 50 µl de lisado celular por poço.

2.5.2. Supressão de Atividade pHER3 em Células HCC827

[0303] As células HCC827 (ATCC CRL-2868™), um modelo de câncer de pulmão de células não pequenas acionado por EGFR mutante (NSCLC), foram tratadas com anticorpos de teste ou controle, conforme descrito acima na seção de Exemplo 2.5.1 (vide acima). Conforme mostrado na Figura 8A, o anticorpo 2C2 foi capaz de inibir parcialmente o sinal pHER3, dado que os anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG MM publicados eram menos efetivos e 10 vezes menos potentes que o 2C2.

2.5.3 Supressão de Atividade pHER3 em Células HCC827 Resistentes a Gefitinib

[0304] HCC827 abriga e é acionado por EGFR mutante, que o torna altamente sensível aos inibidores de tirosina-quinase EGFR (TKIs), tal como, gefitinib. As células HCC827 parentais foram expostas a uma dose tóxica constante de gefitinib e os clones resistentes foram isolados que foram mostrados para abrigar cMET amplificado, um mecanismo conhecido para os cânceres escaparem da terapia TKI. As células HCC827 resistentes a TKI foram tratadas com os anticorpos monoclonais anti-HER3, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.5.1 (vide acima). Conforme mostrado na Figura 8B, o anticorpo monoclonal anti-HER3 2C2 supriu a atividade HER3 no

HCC827 mutante resistente a gefitinib. Similar aos resultados observados para a linha celular parental, 2C2 exibiu a potência mais alta que os anticorpos AMG e MM (cerca de 10 vezes melhor potência) na linha celular HCC827 resistente a TKI.

2.5.4. Supressão de Atividade pHER3 em Células MKN45

[0305] Mesmo que cMET não seja um membro da família Her, esse mostrou ser capaz de formar dímeros com HER3. A linha celular de modelo de câncer gástrico amplificada por MKN45 cMET foi usada para avaliar se os anticorpos anti-HER3 podem antagonizar a ativação HER3 acionada por cMET. As células MKN45 foram tratadas com os anticorpos monoclonais anti-HER3, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.5.1. Conforme mostrado na Figura 8C, todos os três anticorpos monoclonais anti-HER3 (2C2, AMG e MM) foram capazes de suprimir pHER3 em células MKN45, porém, 2C2 exibiu a potência mais alta que os anticorpos AMG e MM (aproximadamente 5-7 vezes melhor potência).

2.5.5. Supressão de Atividade pHER3 em Células Kato III

[0306] Além do acoplamento ao EGFR, HER2 e cMET, HER3 dimeriza com FGFR2 para facilitar seu potencial de transformação. A linha celular Kato III (ATCC No. HTB-103™), um modelo de câncer gástrico amplificado por FGFR2, foi usada para avaliar se os anticorpos anti-HER3 podem suprimir a ativação HER3 acionada por FGFR2. As células Kato III foram tratadas com os anticorpos monoclonais anti-HER3, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.5.1 (vide acima). Nesse modelo, todos os três anticorpos monoclonais anti-HER3 (2C2, AMG, e MM) atingiram extensões máximas similares de supressão pHER3 (~60%), porém, conforme medidos por IC₅₀, 2C2 foi 15-20 vezes mais potente que os anticorpos AMG e MM, respectivamente (Figura 8D).

2.5.6. Supressão de Atividade pHER3 em Células BT-474

[0307] Os dímeros HER2-HER3 foram mostrados por serem uma das entidades oncogênicas mais transformadoras em câncer. Consequentemente, foram investigados os anticorpos monoclonais anti-HER3 na linha celular BT-474 (ATCC NO. HTB-20™), um modelo de câncer de mama amplificado por HER2 bem estabelecido que não expressa o ligante e espera-se que seja acionado pela dimerização HER2-HER3 independente de ligante. As células BT-474 foram tratadas com os três anticorpos monoclonais anti-HER3 e, também, 2C2-YTE, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.5.1. Ao contrário dos modelos onde todos os três anticorpos monoclonais anti-HER3 testados eram ativos, tais como, células HCC827, células HCC827 resistentes a Gefitinib, células MKN45, e células Kato III, 2C2 (tanto 2C2 pai como 2C2-YTE mutante) foi o único entre os anticorpos monoclonais anti-HER3 testados que mostrou atividade substancial que suprime pHER3 (**Figura 8E**). Esses resultados indicaram que 2C2 (tanto a forma 2C2 pai como 2C2-YTE mutante) era funcional em um modelo independente de ligante e demonstrou a bifuncionalidade de 2C2 tanto em configurações dependentes de ligante como independentes de ligante.

2.6. Ensaio para Fosforilação AKT (pAKT) em Modelos de Células para Câncer Gástrico e de Mama

2.6.1. Ensaio de Células pAKT

[0308] As células (células cancerosas gástricas MKN45, células cancerosas gástricas Kato III, ou células de câncer de mama BT-474 amplificadas por HER2) foram colocadas em placas a uma densidade de 30.000 células/poço em placas de 96 poços e foram permitidas a se fixar de um dia para o outro. As células, então, foram tratadas com anticorpos de teste ou controle na curva de dose indicada a 37°C por 4 horas. No final do tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. As células foram lisadas em 80 µl de Triton X tampão de lise (Boston BioProducts, Ashland, MA) com inibidores de protease

e fosfatase (Calbiochem, La Jolla, CA), e foram armazenadas a -20°C até a análise. AKT/pAKT foram analisadas com base no protocolo do fabricante incluído no Kit de lisado celular total Phospho (Ser473)/AKT Total (Cat. No. K15100D, Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD) para determinar o teor pAKT.

2.6.2. Supressão de Atividade pAKT em Células MKN45

[0309] Para verificar se 2C2 pode suprimir HER3 a via de sinalização a jusante além de pHER3, avaliou-se de maneira adicional sua capacidade para suprimir a fosforilação AKT no modelo de câncer gástrico MKN45 acionado por cMET amplificado. As células MKN45 foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-HER3, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.6.1. Neste sistema de modelo, o anticorpo monoclonal 2C2 atingiu a inibição pAKT parcial com potência mais alta (aproximadamente 5-7 vezes mais alta) que os anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM (**Figura 9A**). Isso demonstrou que 2C2 não apenas inibe a atividade HER3, mas, também suprime as moléculas efetoras a jusante de HER3, tal como, pAKT.

2.6.3. Supressão Atividade de pAKT em Células Kato III

[0310] Para investigar se essa atividade se converteu em uma melhor potência que suprime pAKT, o efetor de HER3, analisou-se a inibição pAKT através de diversos anticorpos monoclonais anti-HER3 usando nesta linha celular um ensaio Meso-Scale Discovery, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.6.1. Conforme mostrado na Figura **9B**, coerente com os dados pHER3, 2C2 supriu pAKT nas células de modelo de câncer gástrico Kato III amplificadas por FGFR2. 2C2 novamente atingiu a potência mais alta (conforme medida por IC₅₀) e a resposta máxima em inibição pAKT que os anticorpos AMG e MM.

2.6.4. Supressão de Atividade pAKT em Células BT-474

[0311] Os dímeros HER2-HER3 foram mostrados por serem uma das entidades oncogênicas mais transformadoras em câncer.

Consequentemente, investigou-se a atividade de anticorpos monoclonais anti-HER3 na linha celular BT-474. As células BT-474 foram tratadas com os anticorpos monoclonais anti-HER3, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.6.1, supra e, também, com a forma YTE mutante de 2C2. Ao contrário dos modelos onde todos os três anticorpos monoclonais anti-HER3 testados (2C2, AMG e MM) eram ativos, tais como, células MKN45 e KatolIII, 2C2 (tanto a forma 2C2 pai como 2C2-YTE mutante) foi o único entre os anticorpos monoclonais anti-HER3 testados que mostrou atividade substancial que suprime pAKT (**Figura 9C**). Esses resultados indicaram que 2C2 (tanto a forma 2C2 pai como 2C2-YTE mutante) era funcional em um modelo independente de ligante e demonstraram a bifuncionalidade de 2C2 (tanto a forma 2C2 pai como 2C2-YTE mutante) configurações dependentes de ligante como independentes de ligante.

2.7. Supressão de Sinalização HER3 e Proliferação celular em Células MDA-MB-361.

[0312] Para caracterizar a atividade de 2C2-YTE em células de câncer de mama amplificadas por HER2 que não são altamente responsivas a trastuzumab, focalizou-se em MDA-MB-361 (ATCC No.HTB-27), um modelo de câncer de mama que abriga a mutação de ativação em PIK3CA (E545K), que pode contribuir para sua resistência a trastuzumab devido à ativação intrínseca da via PI3K (Junttila et al, 2009, Cancer Cell. 15:429-40). Determinaram-se os efeitos de 2C2 na sinalização HER3 e proliferação celular nesse modelo.

[0313] Para avaliar a sinalização da linha celular de mama humana, MDA-MB-361 foi colocado em placas de 24 poços a uma densidade de 150.000 células por poço em RPMI (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS) (Invitrogen). No dia seguinte, o meio de plaqueamento foi removido e as células foram submetidas à incubação com o anticorpo anti-HER3 2C2 ou um

anticorpo de controle, em meio completo a uma concentração final de 30 µg/mL. Após uma incubação de 6 horas em 5% de CO₂ a 37°C, as células foram lavadas uma vez com PBS gelado e, então, lisadas adicionando-se tampão redutor Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA). Após uma breve incubação, os lisados celulares foram coletados, quantidades iguais foram carregadas sobre Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) e as proteínas transferidas para as membranas PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó sem gordura e 0,1% de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) em TBS (pH 7,4) e incubadas de um dia para o outro a 4°C com anticorpos em HER3 (anticorpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) e pHER3 (anticorpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). As membranas foram lavadas em 0,1% de Tween 20 em TBS e, então, incubadas por 1 hora em anticorpos secundários de estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz-forte (GE Healthcare). Após a lavagem, as bandas de proteína foram detectadas em filme de raios-X usando-se SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate e SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

[0314] Para acessar a proliferação celular MDA-MB-361 as células foram semeadas a uma densidade de 2.000 células em 100 µL de meio contendo 10% de FBS inativado por calor; placas de 96 poços tratadas com cultura de tecidos de poliestireno branco Costar com fundos planos (Corning) foram usadas. No dia seguinte, o meio de plaqueamento foi removido e os anticorpos foram adicionados ao meio completo em um volume final de 100 µL por poço. As placas, então, foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por 6 ou 14 dias. Para o ensaio de 14 dias, anticorpos frescos foram aplicados no Dia 7. Volumes iguais de reagente CellTiter-GloR (Promega) foram adicionados a cada poço e no final de cada ponto de tempo. As placas foram agitadas em um agitador de placas por 10

minutos a temperatura ambiente para assegurar a lise celular completa. A luminescência foi medida usando um EnVision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer).

[0315] 2C2 reduziu os níveis pHER3 (**Figura 10A**) e supriu o crescimento celular (**Figura 10B**) dessa linha celular, que sugere que 2C2-YTE não apenas é ativo em cânceres sensíveis a trastuzumab com amplificação HER2, mas, também, ativos em cânceres amplificados por HER2 que são menos sensíveis a trastuzumab devido às mutações em PIK3CA.

2.8. Identificação de Novos Tipos de Câncer dependentes de HRG

[0316] Para identificar o câncer dependente de HRG novo adicional vezes múltiplos carcinomas de células escamosas do pulmão (SCC) as linhas celulares foram verificadas para atividade de sinalização de HER3 e expressão de HRG. As linhas celulares HARA-B (JCRB No. JCRB1080.1) e KNS-62 (JCRB No. IFO50358) expressaram níveis significativos de HER3, HRG, assim como, pHER3 (dados não mostrados). Consequentemente, investigou-se a atividade de 2C2 nas linhas celulares HARA-B e KNS-62. As células foram tratadas com os anticorpos monoclonais anti-HER3 basicamente, conforme descrito acima na seção de Exemplos 2.4 supra, 2C2 foi capaz de reduzir níveis pHER3 na linha celular HARA-B (**Figura 11**) e linha celular KNS-62 (dados não mostrados). Conforme mostrado abaixo (Exemplos, seção 5.4), 2C2-YTE demonstrou a eficácia antitumoral dose-dependente no modelo de xenoenxerto escamoso humano HARA-B NSCLC. Deste modo, esses critérios (isto é, expressão de HER3, HRG assim como, pHER3) podem ser ferramentas de triagem úteis para identificar tipos de câncer adicionais responsivos aos anticorpos anti-HER3, que incluem, por exemplo, 2C2, AMG, MM, conforme descrito no presente documento e outros conhecidos na técnica (vide por exemplo Publicações de Patente Internacional WO2011/136911, WO2012/019024, WO2010/022814).

2.9. HER2 é um Acionador Principal em determinados Tipos de Câncer dependentes de HRG

[0317] Na presença da heregulina ligante HER3 (HRG), HER3 heterodimeriza com EGFR ou HER2, o que leva à fosforilação de HER3 e transmissão de um sinal oncogênico através da fosfoinositida 3 quinase (PI3K) e proteína quinase B (PKB), também conhecida como AKT. Uma coleção de modelos CRC foi caracterizada para determinar qual receptor tirosina quinase, EGFR ou HER2, é o acionador principal da sinalização através de HER3. De maneira específica, seis linhas celulares tumorais CRC, SW620 (ATCC No.CCL-227), SW480 (ATCC No.CCL-228), Colo205 (ATCC No.CCL-222), LOVO (ATCC No.CCL-229), HCT15 (ATCC No.CCL-225), e Caco-2 (ATCC No.HTB-37), foram tratadas com antagonistas de HER2 ou EGFR sozinhos ou em combinação com o 2C2 antagonista de HER3. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço. No dia seguinte, 2 conjuntos idênticos de células foram tratados com 10 µg/mL dos seguintes anticorpos: anticorpo anti-HER3 2C2, anticorpo de IgG de controle R347, anticorpo anti-HER2 2C4 (por exemplo, Publicação de Patente WO2001/00245), o anticorpo cetuximab anti-EGFR ou o inibidor tirosina quinase EGFR gefitinib a 5 µM. Após 5-6 horas de incubação a 37°C, HRG foi adicionada a 50 ng/mL em um conjunto de células por 15 minutos a 37°C. Todas as células, então, foram lavadas com PBS frio e lisadas através da adição de 60 µL de 2× tampão de amostra SDS (dodecil sulfato de sódio) (Invitrogen). Os lisados foram transferidos para tubos de 1,5 mL e fervidos durante 5 minutos seguido pelo arrefecimento em gelo por 2 minutos. Os volumes iguais (20 µL) de amostras de proteína foram resolvidos em géis NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) antes da transferência para as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen). As membranas foram lavadas em Solução Tris salina tamponada (KPL) contendo 0,1% de Tween 20

(Sigma) e incubadas de um dia para o outro a 4°C com anticorpos em HER3 (Santa Cruz Biotechnology), pHER3-Tyr1289 (Cell Signaling Technology), phosphorylated AKT (protein kinase B (pAKT)) (Cell Signaling Technology), phosphorylated ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (pERK)) (Cell Signaling Technology), e glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Sigma). As membranas foram lavadas em solução Tris salina tamponada (KPL) contendo 0,1% de Tween 20 (Sigma) e, então, incubadas por 1 hora em anticorpos secundários conjugados com peroxidase de raiz-forte (GE HealthCare). Após a lavagem, as bandas de proteína foram detectadas no filme de raios-X usando-se SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Scientific).

[0318] Conforme observado na **Figura 12**, tanto os anticorpos anti-HER3 como anti-HER2 reduziram os níveis de HER3, pHER3 e pAKT em células estimuladas por ligante enquanto o antagonista EGFR, tal como, tratamento cetuximab e gefitinib não teve efeitos nessas moléculas de sinalização. Esses dados demonstram que HER2 é o acionador principal de sinalização HER3 induzida por HRG em todos os modelos de câncer testados.

Exemplo 3. Mecanismo de Estudos de Ação para Anticorpos Monoclonais anti-HER3

3.1. Clone 16 Bloqueou Parcialmente a Ligação ao Ligante para HER3

[0319] A eficácia de anticorpos monoclonais anti-HER3 para bloquear atividade HER3 induzida por ligante pode ocorrer devido a sua capacidade de bloquear diretamente ligação ao ligante. Para investigar esse cenário, estabeleceu-se um ensaio de ligação HRG-HER3 *in vitro* ao revestir uma placa com heregulina (HRG) e ligar a proteína recombinante marcada HER3 a essa.

3.1.1. Ensaio de ligação HRG-HER3

[0320] Os poços de microplacas foram revestidos com 10ng/ml de heregulina (HRG□1, Cat. No. 377-HB, R&D Systems, Minneapolis, MN) de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST (PBS + 0,05% de Tween 20) e bloqueadas em PBS + 1 µg/ml de BSA a temperatura ambiente por 1 hora. Durante o bloqueio, as diluições em série de anticorpos de teste (Clone 16, AMG, MM e um anticorpo monoclonal de bloqueio de ligante anti-HER3 de controle positivo) foram preparadas em uma placa separada em PBSTB (PBS+0,05% de Tween 20 + 0,1% de BSA) e combinadas com 5 µg/ml de HER3 recombinante (Cat. No. 348-RB, R&D Systems, Minneapolis, MN) a temperatura ambiente por 30 minutos. As placas ELISA foram, então, lavadas 4x com PBST antes da adição de mistura de anticorpo-HER3. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e foram subsequentemente lavadas 4 vezes com PBST. Anti-His HRP (Cat. No. 34460, Qiagen, Valencia, CA) foi adicionada a temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram lavadas 4 vezes com PBST seguidas pela detecção com TMB. As placas foram lidas a 450nm usando um leitor de microplacas. Os resultados representativos são mostrados na **Figura 13**.

3.1.2. Resultados

[0321] A capacidade de diversos anticorpos monoclonais (Clone 16, AMG, MM e um anticorpo monoclonal de bloqueio de ligante anti-HER3 de controle positivo) para interferir na ligação de HRG ao HER3 foi testada. O anticorpo monoclonal de bloqueio de ligante HER3 de controle positivo supriu de maneira eficiente e completa a ligação HER3 a HRG. Em contrapartida, o Clone 16 (a derivação parental para 2C2, vide seção de Exemplos 1.6 "Otimização de afinidade" acima) foi apenas parcialmente eficaz na interrupção dessa ligação (aproximadamente 30% de inibição máxima). Os anticorpos monoclonais AMG e MM mostraram efeito de bloqueio parcial fraco similar (**Figura 13**). Essas descobertas

mostraram que era improvável que o Clone 16 funcionasse como um anticorpo monoclonal de bloqueio de ligante direto.

3.2. 2C2 Interrompe a Dimerização HER2-HER3

[0322] Devido a sua natureza deficiente de quinase, o monômero HER3 não é ativo e esse precisa formar heterodímeros com outros RTKs para ser ativo. O dímero HER2:HER3 foi mostrado por ser a espécie de sinalização mais oncogênica tanto em configurações dependentes de ligante como independentes (Junttila et al, 2009, Cancer Cell. 15:429-40). A interrupção de dimerização HER2-HER3 por 2C2 foi avaliada usando um ensaio de formação de dímero HER2-HER3 induzido por HRG em células T-47D, um modelo de câncer de mama dependente de ligante que mostra a formação de dímero HER3-HER2 induzida por HRG, e em células BT-474 independentes de ligante. O ensaio se baseou na co-imunoprecipitação HER3-HER2.

3.2.1. Ensaio de Dimerização HER2-HER3 induzido por Ligante

[0323] células T-47D (ATCC Cat. No. HTB-133TM) foram semeadas a 1×10^6 /poço em placas de 6 poços de um dia para o outro. Na manhã seguinte, as células foram tratadas com anticorpos monoclonais 2C2, CL16, AMG e MM a uma concentração de 5 µg/ml em soro total por 2 horas a 37°C. Os controles não incluíram nenhum tratamento de anticorpos, ou tratamento com controle R347 IgG1. O tratamento foi seguido por tratamento de HRG de 50ng/ml por 10 minutos a 37°C (incluindo um controle não tratado com HRG). As células foram lavadas 3 vezes com PBS frio antes de adicionar 500 µl de tampão de lise celular, que inclui inibidores de protease e fosfatase (Sigma, St. Louis, MO). As células foram lisadas em gelo por pelo menos 30 minutos. Os lisados foram colhidos com um raspador de células. 50 µl de uma solução de grânulos de proteína A contendo 25 µl de grânulos de proteína A conjugadas com 1 µg de anti-HER3 mAb (Cat. No. MAB3481, R&D Systems, Minneapolis, MN) foram adicionados a 500 µl

do lisado celular e transferidos para colunas de imunoprecipitação (IP). As colunas IP foram giradas de um dia para o outro a 4°C. Subsequentemente, as colunas IP foram giradas para baixo para remover os lisados, e os grânulos foram lavados com tampão de lise celular frio. 50 μ l de 2X SDS de tampão de amostra contendo 50 mM de DTT foram adicionados a cada coluna IP, e as colunas foram fervidas por 4 minutos. A ponta inferior de cada coluna foi removida, e as colunas foram giradas para baixo para coletar os eluatos. 20 μ l de eluato foram separados usando SDS-PAGE. Western blotting foi realizado tanto para HER2 como HER3 (com anticorpo anti-HER2 Cat. No. OP15L, CalBiochem, La Jolla, CA; e anticorpo anti-HER3 Cat. No. SC-285, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

3.2.2. Ensaio de dimerização HER2-HER3 Independente de Ligante

[0324] As células BT-474 (ATCC Cat. No. HTB-20TM) foram colocadas em placas a uma densidade de 1×10^6 células por poço em uma placa de 6 poços em meio de cultura de celular RPMI completo 1640 com 10% de FBS inativado por calor. No dia seguinte, o meio de plaqueamento foi removido e substituído por RPMI completo fresco 1640 contendo dose de saturação de anticorpos de teste. Nesse experimento, CL16, a versão de afinidade inferior de precursor de 2C2, 2C2, e R347, uma IgG de controle, foram testados a uma concentração de 5 μ g/mL. As células foram incubadas com anticorpos por 2 horas a 37°C. Então, o meio foi removido, e as células foram lavadas uma vez com PBS frio. O reticulador 3, 3'-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato] (DTSSP) foi adicionado a uma concentração de 2 mM em 1 mL de PBS frio. As células foram incubadas por pelo menos 1 hora em gelo. As células, então, foram lavadas 3 vezes com PBS frio. O tampão de lise celular (500 μ L) contendo inibidores de protease e fosfatase foi adicionado e as células foram colocadas em gelo por pelo menos 30 minutos para permitir a lise antes da colheita com um raspador de

células. HER2 e HER3 foram imunoprecipitados a partir dos lisados celulares. Os lisados celulares (500 µL) foram combinados com 50 µL de grânulos de sefarese de proteína A (50% de pasta fluida; Invitrogen) pré-conjugados em 1 µg de HER3 MAb (MAB3481, R&D Systems) em uma coluna de giro SigmaPrep (Sigma). A mistura foi incubada com rotação a 4°C de um dia para o outro. No dia seguinte, os grânulos foram separados do lisado celular por centrifugação. Os grânulos nas colunas foram lavados quatro vezes com tampão de lise celular frio (Cell Signaling Technologies) contendo inibidores de protease (Sigma) e fosfatase (EMD Millipore). Após o procedimento de lavagem, 50 µL 2× de tampão de amostra de SDS (dodecil sulfato de sódio) contendo 50 mM de ditiotreitol (DTT; EMD Chemicals) foram adicionados nas colunas de giro. As colunas foram, então, fervidas por 4 minutos. As proteínas foram eluídas por centrifugação e imediatamente usadas para immunoblotting (como efetuado na seção 2.4).

3.2.3. Resultados

[0325] As células T-47D tratadas ou não tratadas com HRG foram lisadas. HER3 foi precipitado com anticorpo monoclonal anti-HER3, então, as proteínas no pélete foram resolvidas em SDS-PAGE e blotted para a presença de HER2 como sinais de interação HER2-HER3. O modelo era induzível por ligante uma vez que o dímero ocorreu apenas após estimulação com ligante. Um pré-tratamento com 2C2 preveniu eficientemente a formação de dímero, demonstrando sua capacidade de impedir a formação de dímero HER2-HER3 induzida por ligante. Descobriu-se também que Outros anticorpos monoclonais anti-HER3 que incluem MM, AMG, e o Clone parental 16 são eficazes (**Figura 14A**). Quando o reticulador foi usado para estabilizar bioquimicamente os complexos de proteína, o heterodímero HER2:HER3 constitutivo foi capturado na ausência de HRG nas células BT-474, indicando uma formação de heterodímero independente de ligante. O pré-tratamento

de células com 2C2 ou CL16 interrompeu efetivamente essa formação de heterodímero (**Figura 14B**).

3.3. Internalização e Degradação HER3 Induzida por 2C2

[0326] A internalização e degradação alvo são dois mecanismos comuns através dos quais os anticorpos monoclonais inibem suas funções alvo. Primeiro, avaliou-se a internalização HER3 mediada por 2C2 nas células de câncer de mama BT-474. A seguir, verificou-se se essa internalização HER3 induzida por 2C2 rápida pode ser seguida pela degradação alvo.

3.3.1. Ensaio de Internalização HER3

[0327] A internalização HER3 foi determinada usando um ensaio Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). As células BT-474 foram separadas com enzima Accutase e suspensas em PBS contendo 1% de BSA (tampão FACS) a uma densidade celular de 10×10^6 células/ml. 50 μ l de células foram adicionados a cada célula de uma placa de 96 poços em fundo "U". 50 μ l de anticorpos monoclonais anti-HER3 mais controle de Isótopo (a 20 μ g/ml) foram adicionados em cada poço para atingir uma concentração final de 10 μ g/ml. A placa foi incubada a 37°C por 0,5 horas, 2 horas e 4,5 horas, respectivamente. As células foram lavadas com tampão FACS frio duas vezes (células foram peletizadas por centrifugação a 1.500 rpm por 2 minutos). As células foram resuspensas com tampão FACS frio contendo anticorpo monoclonal de bloqueio de ligante HER3 anti-humano de camundongo (Cat. No. MAB3481, R&D Systems, Minneapolis, MN) a 1 μ g/ml ou 10 μ g/ml.

[0328] As células e HER3 anti-humano foram incubados em gelo por 1 hora. As células, então, foram lavadas duas vezes com tampão FACS frio. As células foram subsequentemente resuspensas com tampão FACS frio contendo um anticorpo secundário marcado por Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) (1:200 v/v), e incubadas em gelo por 30-45 minutos. As células, então, foram lavadas com tampão FACS frio duas

vezes e resuspensas com 100 μ l de tampão FACS frio. Nesse ponto, FACS foi realizado. A Média Geométrica Absoluta de intensidades de fluorescência (GMFI) foi obtida subtraindo-se a GMFI dos controles que incluem apenas o anticorpo secundário. A folga superfície HER3 relativa foi calculada comparando-se os resultados obtidos usando um anticorpo monoclonal de controle IgG. Os resultados representativos são mostrados na **Figura 15A**.

3.3.2. Ensaio de Degradação Proteína HER3

[0329] As células cancerosas de modelo colorretal Lovo, HCT15 e SW620 (ATCC Nos. CCL-229, CCL-225 e CCL-227, respectivamente) foram semeadas em $1,5 \times 10^5$ /poço em placas de 24 poços. Após a fixação de um dia para o outro, as células foram tratadas com 2C2 e anticorpo monoclonal de controle por 3-4 horas. As células foram lavadas com PBS frio uma vez, diretamente lisadas com 50-60 μ l de 2X de tampão de amostra SDS e fervidas a 100°C por 10 minutos. 20 μ l de amostras foram carregadas em géis de SDS-PAGE, eletroforeticamente separadas, e Western blotted com anticorpo contra HER3 (Santa Cruz Biotech) para quantificar os níveis de proteína HER3 totais. Os anticorpos contra GAPDH (Sigma) também foram usados para quantificar os níveis GAPDH como um controle de carga de proteína geral.

3.3.3. Resultados

[0330] Conforme mostrado na Figura 15A, ambas as doses de 2C2 tiverem um impacto muito similar. Um tratamento de 30 minutos causou uma perda de 39% de população HER3 de superfície (61% restante), dado que um tratamento de 2 horas causou uma perda de 62% (38% restante), sugerindo uma internalização alvo rápida por 2C2. De maneira adicional, quando três modelos de câncer colorretal diferentes foram incubados com 2C2, a degradação HER3 completa foi observada em células SW620, dado que a degradação quase completa foi

observada em outras duas linhas celulares (**Figura 15B**), demonstrando que 2C2 era capaz da capacidade de degradação alvo rápida.

3.4. Funções Efetoras: Citotoxicidade Mediada por Célula Dependente de Anticorpo (ADCC) e Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

[0331] ADCC é um modo reconhecido através do qual um anticorpo monoclonal pode conferir sua eficácia antitumoral *in vivo*. Para avaliar a atividade ADCC do Clone 16, usou-se um ensaio ADCC ativados por PBMC *in vitro* em dois modelos de câncer de mama amplificados por HER2-: BT-474 e SkBR3. Herceptin/Trastuzumab foi usado como controle positivo uma vez que este foi mostrado para conferir o efeito ADCC nesse tipo de cânceres. Em ambos os modelos observou-se efeitos de extermínio de tumor significativos a partir da Herceptin, porém, os anticorpos monoclonais restantes testados, Clone 16, AMG e MM, foram amplamente inativos, indicando que eles perderam o efeito ADCC apreciável (dados não mostrados). 2C2-YTE foi testado em ensaios CDC usando soro humano como uma fonte de complemento. Além disso, o anticorpo trastuzumab anti-HER2 e o anticorpo rituximab anti-CD20, foram incluídos como controles. Nenhum dos anticorpos que inclui 2C2-YTE mostrou nenhuma atividade CDC detectável em nenhuma concentração (dados não mostrados). As células SkBR3 não expressam CD20. Como um controle positivo, rituximab demonstrou atividade de extermínio celular substancial em um ensaio CDC similar contra células Daudi, que expressam CD20 (dados não mostrados).

3.5. Parada do Ciclo Celular

3.5.1. Ensaio de Parada do Ciclo Celular em Células de Câncer de Mama SkBR3

[0332] BioSantecells (ATCC No.HTB-30) foram colocada sem placas a uma densidade de 150.000 células/poço em uma placa de 6 poços e permitidas a se fixar de um dia para o outro. No dia seguinte, o

meio foi removido e substituído por meio de crescimento fresco contendo anticorpos de teste e controle. As células foram, então, incubadas a 37°C por 48 horas. No final do tratamento, as células foram tripsinizadas, acumuladas em um tubo cônico de 15 ml, e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. As célula foi, então, lavada uma vez com PBS e fixada em 70% de etanol gelado a -20°C de um dia para o outro.

[0333] Seguindo a fixação, as células foram centrifugadas, conforme descrito acima, lavadas uma vez em PBS, e resuspensas em solução de coloração (PBS+0,1% de Triton X-100, 0,2 mg/ml de RNase A livre de DNase, e 20 µg/ml de iodeto de propídio). As células foram coloridas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro, e analisadas usando um Sistema de Citometria de Fluxo LSRII (BD Biosciences). Iodeto de propídio foi detectado usando o canal Texas Red; os dados foram analisados usando o pacote de análise de Citometria de Fluxo FlowJo (Tree Star, Inc., OR) usando o Modelo Dean/Jett/Fox.

3.5.2. Resultados

[0334] A análise de ciclo celular à base de FACS mostrou que em células SkBR3, uma linha celular de câncer de mama amplificada por HER2similar a BT-474, tanto a Herceptin como o Clone 16 (derivação parental para 2C2) causaram a parada do ciclo celular em fase G1 (população G1 aumentada diminuindo-se as populações S/G2, conforme mostrado na **Figura 16**).

3.6. Efeitos Anti-angiogênicos através do Bloqueio de Secreção VEGF induzida por HRG

[0335] HRG foi mostrada para acionar a secreção de VEGF, uma citoquina pró-angiogênica principal, em diversos modelos de câncer. Portanto, avaliou-se os efeitos inibitórios de 2C2 na supressão de secreção VEGF induzida por HRG em dois modelos de câncer de mama: MCF-7 e BT-474.

3.6.1. Ensaio de Secreção VEGF induzida por HRG

[0336] As células MCF-7 e células BT-474 foram colocadas em placas a uma densidade de 100.000 células/poço em uma placa de 24 poços, e foram permitidas a descansar por 2 dias. O meio foi, então, removido e substituído com 500 μ l de meio de crescimento fresco contendo 2% de FBS e anticorpos de controle e teste. Seguindo a incubação de 24 horas, o meio de cultura de celular foi coletado e os níveis VEGF foram determinados usando um Kit VEGF ELISA (R&D Systems DY293B). O número de células relativo em cada poço foi determinado adicionando-se meio fresco às células junto com Cell Titer Glo (Promega, razão de 1:1) e placas de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A luminescência foi lida usando um leitor de placa, e esses valores foram usados para normalização dos dados.

3.6.2. Resultados

[0337] O tratamento HRG induziu aumentos drásticos na secreção VEGF na BT-474 (**Figura 17A**) e MCF-7 (**Figura 17B**) ambas as linhas celulares de modelo de câncer de mama variaram de 6,5 vezes a 8 vezes. CL16 (Clone 16), e anticorpos monoclonais MM foram capazes de suprimir a maioria dos aumentos, sugerindo que esses anticorpos monoclonais anti-HER3 podem conferir efeitos de modulação vascular adicionais.

Exemplo 4. Reatividade Cruzada com HER3 de Macaco Cinomolgo e Camundongo

4.1. 2C2 se Liga ao HER3 de Cinomolgo e Camundongo com Afinidade Similar ao HER3 Humano

[0338] Ensaios Biacore foram realizados basicamente conforme descrito acima para comparar a afinidade de 2C2 ao HER3 humano, de macaco cinomolgo (cino) e camundongo para permitir a seleção de espécie de toxicidade relevante (porção superior da Tabela 7). Os ensaios Biacore adicionais foram realizados para 2C2-YTE usando um

instrumento BIACore de resolução mais alta, um reagente de captura Fc alternativo e um protocolo de injeção refinado para corrigir a ligação de fundo. Resumidamente, reagente de captura de Proteína A foi immobilizado sobre duas células de fluxo adjacente conectadas em série no mesmo chip de sensor CM5, usando um protocolo de amina padrão, conforme delineado pelo fabricante do instrumento. Uma dessas superfícies de Proteína A foi usada como uma superfície de referência para esse experimento, enquanto a outra serviu como a superfície ativa para registrar a captura de IgG e a ligação HER3 (ECD) subsequente. As densidades de Proteína A finais nas superfícies celulares de fluxo de referência e ativo foram registradas como 1986 RUs e 1979 RUs, respectivamente. Conforme configurado, o método foi ajustado de modo 2C2-YTE IgG fosse capturada primeiro apenas sobre a superfície de Proteína A ativa, seguido por uma injeção de uma solução de proteína HER3 tanto ao longo das superfícies celulares de fluxo ativo como de referência. Com isso, essa estratégia corrige a curva de ligação para qualquer ligação não específica do analito HER3 à superfície de captura de Proteína A. Para a etapa de captura de IgG, 2C2-YTE IgG foi preparada a 10 nM em HBS-EP+ tampão de instrumento (0,01 M de HEPES, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, e 0,05% de P20), então, injetada ao longo da superfície celular de fluxo de Proteína A ativa por 30 segundos a uma taxa de fluxo de 10 µL/min. A proteína HER3 humana, cíno e murino foi, então, inicialmente preparada a 500 nM de soluções de estoque em tampão de instrumento, então, as séries de diluição em série em duas vezes de cada foram geradas para proporcionar uma concentração final de 0,39 nM. A proteína HER3 foi, então, injetada tanto ao longo das superfícies celulares de Proteína A ativa como de referência por 120 segundos, a uma taxa de fluxo de 75 µL/min. Os dados de dissociação foram coletados por 15 minutos, seguidos por dois pulsos de 60 segundos com 10 mM de tampão Gly, pH 1,7, entre injeções para

regenerar as células de fluxo de volta para as superfícies de captura de Proteína A. Diversas injeções de tampão também foram espalhadas ao longo das séries de injeção. As injeções de tampão de seleção foram subsequentemente usadas junto com os dados de célula de referência para corrigir os conjuntos de dados brutos para artefatos de injeção e/ou interações de ligação não específicas, uma técnica comumente referida como “double-referencing” (Myszka, 1999). Os dados de ligação totalmente corrigidos que foram, então, globalmente ajustados em um modelo de ligação 1:1 (software BIAevaluation 4.1) que inclui um termo para corrigir a ligação limitada por transporte de massa, devem ser detectados. Essa análise determinou as constantes de taxa cinética (k_{on} , k_{off}), a partir das quais o K_D aparente foi, então, calculado como k_{off}/k_{on} (parte inferior da Tabela 7). A variação nos valores K_{on} e K_{off} entre os dois conjuntos de experimentos ocorre provavelmente devido às diferenças entre os dois protocolos, conforme detalhado acima, e geralmente se encontrou dentro da faixa de erro de duas vezes para medir esses parâmetros cinéticos. Conforme mostrado **TABELA 7**, a afinidade de 2C2, e 2C2-YTE ao HER3 de cino foi virtualmente idêntica àquela do HER3 humano. A afinidade para HER3 de camundongo se encontrou dentro de 3 vezes da afinidade para HER3 humano.

TABELA 7: Ensaio de ligação Biacore que mostra afinidade do 2C2 ao HER3 humano, de cino e camundongo.

Captura de IgG	2C2 (exp34c, 34d,43b)	2C2 (exp43d)	2C2 (exp43f)
Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cino HER3-His
Formato	Captura de IgG (Fc)	Captura de IgG (Fc)	Captura de IgG (Fc)

Captura de IgG	2C2 (exp34c, 34d,43b)	2C2 (exp43d)	2C2 (exp43f)
K_{on} (1/Ms) ($\times 10^5$)	4,27 (+/- 0,45)	3,26	4,66
K_{off} (1/s) ($\times 10^{-4}$)	1,71 (+/- 0,18)	3,78	1,81
K_D (nM)	0,402 (+/- 0,029)	1,16	0,389
IgG Captura	2C2-YTE	2C2-YTE	2C2-YTE
Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cyno HER3-His
Formato	Captura de IgG (Fc)	Captura de IgG (Fc)	Captura de IgG (Fc)
K_{on} (1/Ms) ($\times 10^5$)	1,61	1,11	1,52
K_{off} (1/s) ($\times 10^{-4}$)	0,743	1,91	0,734
K_D (nM)	0,461	1,721	0,483

4.2. Ensaio para Fosforilação induzida por HRG de HER3 de Cinomolgo

[0339] As células Ad293 (Stratagene No. 240085) foram transientemente transfectadas com vetor de expressão cynoHER3 de comprimento total seguindo o protocolo proporcionado pelo reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). As células foram permitidas a incubar a 37°C por 48 horas antes do tratamento. Os anticorpos foram adicionados a 10µg/ml em meio de crescimento completo por 1 hora seguidos pela estimulação com 20ng/ml HRGβ1 (R&D Systems) por 10 minutos a 37°C. No final do tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS. As células foram lisadas com tampão de amostra 2x Novex Tris-glicina (Invitrogen) e os níveis de pHER3 e

HER3 total foram determinados por immunoblotting (Cell Signaling Antibody #4791 e Santa Cruz Antibody #285, respectivamente). A densitometria das bandas foi realizada usando o software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij/).

4.3. Resultados

[0340] Para estabelecer totalmente a ligação e modulação cruzada de HER3 de cino por 2C2, uma linha celular Ad293 estável que expressa ectopicamente o HER3 de cino de comprimento total foi estabelecida, conforme demonstrado por Western Blot (**Figura 18A**). Quando tratado com HRG, o HER3 de cino é submetido à ativação robusta, conforme evidenciado pela indução do sinal pHER3 (**Figura 18B**). Quando as células foram cotratadas com 2C2, porém, não quando elas foram tratadas com o anticorpo de controle R347, a indução pHER3 foi completamente anulada, demonstrando que 2C2 não foi somente capaz de se ligar ao HER3 de cino na superfície celular, mas, também capaz de remover eficientemente por ablação sua ativação (**Figura 18B**). Combinados com esses dados de medição de afinidade Biacore acima que mostram que 2C2 exibiu afinidade idêntica ao HER3 de cino como para HER3 humano, esses resultados validaram o cino como uma espécie de toxicidade relevante para ensaios de 2C2.

Estudos *In Vivo* para Anticorpos Monoclonais anti-HER3

4.4. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Cabeça e Pescoço FADU Humanas Subcutâneas

4.4.1. Método

[0341] As células de Cabeça e Pescoço FADU humanas (ATCC No.HTB-43) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos ao injetar subcutaneamente 5 × 10⁶ de células por camundongo (suspensas em 50% de matriz) nos flancos direitos de camundongos

nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de controle ou uma combinação de 2C2 com anticorpos monoclonais cetuximab foi administrada intraperitonealmente. Para estudos de dependência de dose o 2C2 foi administrado em 3, 5, 7, e 10 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg), o controle em 10 mg/kg. Para os estudos de combinação 2C2 foi administrado em 3 mg/kg, cetuximab em 30 mg/kg e o anticorpo de controle em 6 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

[0342] Na conclusão dos estudos de eficácia com 2C2, os camundongos foram tratados com 2C2 um tempo final conforme indicado para determinar os valores farmacocinéticos. A punção cardíaca foi realizada para coletar sangue em Tubos Separadores de Soro Microtainer (SST). Os tubos com sangue foram agitados suavemente por 10 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos para permitir que o soro coagule. As amostras foram centrifugadas a 1.000 × g por 10 minutos, e as amostras de soro foram cuidadosamente transferidas para novos tubos e armazenadas a -80°C.

[0343] Um formato de Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) foi usado para a determinação quantitativa de 2C2 em soro de camundongo. Os controles de qualidade padrões, e amostras de soro

de camundongo foram incubados com anticorpos IgG anti-humano de cabra que foram imobilizados em uma placa de microtitulação de 96 poços. Após a incubação, materiais não ligados foram removidos através de uma etapa de lavagem e o 2C2 foi detectado usando um IgG anti-humano de cabra com conjugado com peroxidase de raiz-forte. Uma solução de paragem ácida foi adicionada e o grau de turnover enzimático do substrato foi determinado medindo-se a absorbância a 450 nm. A absorbância medida era diretamente proporcional à concentração de 2C2 presente no soro de camundongo. Uma curva padrão 2C2 para o ensaio foi usada para interpolar a concentração das amostras de soro.

4.4.2. Resultados.

[0344] Utilizando-se um modelo de xenoenxerto de Cabeça e Pescoço FADU humana subcutaneamente desenvolvido em camundongos fêmeas sem pelos, 2C2 demonstrou eficácia antitumoral dose-dependente. A eficácia máxima em 99% de inibição de crescimento tumoral (dTGI) foi observada em 7 mg/kg administradas duas vezes por semana para o período de duração do estudo (**Figura 19A**).

[0345] A administração combinada de 3 mg/kg de 2C2 com 30 mg/kg de cetuximab administrados duas vezes por semana durante a fase de tratamento (dias 7–18) mostrou eficácia antitumoral sinérgica clara no modelo de xenoenxerto FADU (**Figura 19B**). Esse efeito foi de longa duração e os tumores só começaram a crescer de novo no final da fase de recrescimento no dia 40. O tratamento de combinação produziu 7 de 10 regressões parciais e 2/10 regressões completas.

[0346] 2C2 reagiu de forma cruzada com HER3 de camundongo e é bem estabelecido que o HER3 é expresso em muitos tecidos de camundongo não doentes. Portanto, o HER3 hospedeiro pode servir como um depósito para absorver o anticorpo monoclonal 2C2 antes que este chegue ao tecido tumoral. Usando camundongos fêmea sem pelos

contendo tumor, 2C2 em 5 mg/kg foi administrado uma ou três vezes nesses camundongos e os níveis de exposição de 2C2 foram seguidos ao longo do tempo. 2C2 foi detectável somente 1 dia após a última dose de 5 mg/kg de 2C2 e se tornou indetectável após 3 dias após o último tratamento (**Figura 36**). Por outro lado, a dosagem com 30 mg/kg de 2C2 usando as mesmas programações que para 5 mg/kg levou a uma janela muito mais prolongada onde 2C2 pode ser medido no soro de camundongo. Essas descobertas demonstraram farmacocinética não linear para 2C2 após a administração de única dose e de dose repetida de 5 mg/kg ou 30 mg/kg aos camundongos contendo tumor. Os dados mostraram que o HER3 de camundongo pode atuar como um depósito para ligar 2C2 administrado aos camundongos e que 30 mg/kg como uma única dose foram suficientes para saturar o depósito.

[0347] A existência de um depósito de HER3 em camundongos para 2C2 foi funcionalmente confirmada administrando-se uma alta dose de carga de 2C2 seguida por uma baixa dose de manutenção em camundongos com tumores de xenoenxerto FADU. A eficácia antitumoral de uma dose de carga de uma dose de manutenção de 3 mg/kg de 2C2 foi demonstrada no modelo tumoral FADU. 10 mg/kg de 2C2 como uma única dose apresentou apenas eficácia antitumoral transitória. 2C2 fornecido em 3 mg/kg duas vezes por semana apresentou eficácia modesta, porém, contínua y. A combinação da dose de carga de 10 mg/kg com a dose de manutenção de 3 mg/kg 2C2 foi mais eficaz no bloqueio do crescimento tumoral comparada a cada esquema de tratamento sozinho (**Figura 21**).

[0348] A capacidade de 2C2 para modular os marcadores farmacodinâmicos pHER3 e pAKT foi testada em extratos de tumor de xenoenxerto FADU. 2C2 foi administrado duas vezes em 30 mg/kg em 48 horas em camundongos contendo tumores de xenoenxerto FADU humana e os extratos foram analisados 24 horas depois. Resumidamente,

camundongos atípicos sem pelos foram implantados subcutaneamente em células cancerosas de cabeça e pescoço FADU. Os animais foram administrados com 2C2 em 30 mg/kg duas vezes em 48 horas. Os extratos foram preparados 24 horas depois para análise de pHER3, pAKT e HER3 total (**Figura 22**, painéis superiores, intermediários e inferiores, respectivamente). R347 foi usado como o anticorpo IgG1 de controle. Havia 6 animais por grupo de tratamento. Os dados são apresentados ± como o desvio padrão médio. Aqui, 2C2 inibiu a fosforilação tanto de HER3 como de AKT em 59,5% e 51,7%, respectivamente, comparados aos tumores de camundongos tratados com IgG1 de controle (**Figura 22**, painéis superiores e intermediários). Nenhuma modulação do HER3 total foi observada por 2C2 (**Figura 22**, painel inferior).

4.5. Estudos de Modelo de xenoenxerto de Cabeça e Pescoço Detroit562 Humano Subcutâneo

4.5.1. Método.

[0349] As células de Cabeça e Pescoço Detroit562 humanas (ATCC No.CCL-138) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de controle ou uma combinação de 2C2 com anticorpos monoclonais cetuximab foi administrada intraperitonealmente. Para estudos de dependência de dose o 2C2 foi administrado em, 1, 3, 10 e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg). Para os estudos de combinação 2C2 foi administrado em 3 mg/kg, cetuximab em 30 mg/kg e o anticorpo de controle em 10 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a

fórmula:

$$\text{volume tumoral} = \pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$$

para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

[0350] Na conclusão dos estudos de eficácia com 2C2, os camundongos foram tratados com 2C2 um tempo final conforme indicado para determinar os valores farmacocinéticos. A punção cardíaca foi realizada para coletar sangue em tubos microtainer SST. Os tubos com sangue foram agitados suavemente por 10 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos para permitir que o soro coagule. As amostras foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 10 minutos, e as amostras de soro foram cuidadosamente transferidas para novos tubos e armazenadas a -80°C .

[0351] Um formato de Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) foi usado para a determinação quantitativa de 2C2 em soro de camundongo. Os controles de qualidade padrões, e amostras de soro de camundongo foram incubados com anticorpos IgG anti-humano de cabra que foram imobilizados em uma placa de microtitulação de 96 poços. Após a incubação, materiais não ligados foram removidos através de uma etapa de lavagem e o 2C2 foi detectado usando um IgG anti-humano de cabra com conjugado com peroxidase de raiz-forte. Uma solução de paragem ácida foi adicionada e o grau de turnover enzimático do substrato foi determinado medindo-se a absorbância a 450 nm. A absorbância medida era diretamente proporcional à concentração de 2C2 presente no soro de camundongo. Uma curva

padrão 2C2 para o ensaio foi usada para interpolar a concentração das amostras de soro.

4.5.2. Resultados

[0352] 2C2 mostrou eficácia antitumoral no modelo de xenoenxerto de Cabeça e PESCOÇO Detroit562 humano subcutaneamente desenvolvido em camundongos fêmeas sem pelos. 10 mg/kg de 2C2 administrado duas vezes por semana foi maximamente eficaz em 72% de dTGI (**Figura 23A**). O modelo Detroit562 contém uma mutação PIK3CA.

[0353] O modelo tumoral Detroit562 foi sensível ao anticorpo monoclonal cetuximab anti-EGFR que causou a inibição de crescimento tumoral em 10 mg/kg administradas duas vezes por semana. A combinação de 3 mg/kg de 2C2 com 10 mg/kg de cetuximab adicionou a eficácia antitumoral de cetuximab e resultou em 9 de 10 regressões parciais enquanto cetuximab sozinho produziu 5/10 regressões parciais (**Figura 23B**).

4.6. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Cabeça e Pescoço CAL27 Humano Subcutâneo

4.6.1. Método.

[0354] As células de Cabeça e Pescoço CAL27 humanas (ATCC No.CRL-2095) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2-YTE, cetuximab ou IgG1 de controle foram administrados intraperitonealmente. Para estudos de dependência de dose o 2C2-YTE foi administrado em 3,10, e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg). As medições de calibre foram

usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:
 volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.6.2. Resultados.

[0355] A atividade dose-dependente de 2C2-YTE foi confirmada em um terço do modelo tumoral de cabeça e pescoço, CAL27, usando 2C2-YTE. 2C2-YTE em 3, 10 ou 30 mg/kg administrado duas vezes por semana mostrou TGI com 26,4%, 55,2%, ou 68,8%, respectivamente, comparados aos animais tratados com IgG1 de controle (**Figura 24**).

[0356] O modelo tumoral CAL27 foi sensível ao anticorpo monoclonal cetuximab anti-EGFR que causou a inibição de crescimento tumoral em 30 mg/kg administradas duas vezes por semana com TGI de 75,0% (**Figura 24**).

4.7. Estudos de Modelo de Xenoenxerto A549 NSCLC Mutado KRAS Humano Subcutâneo

4.7.1. Método

[0357] As células A549 NSCLC humanas (ATCC No.CCL-185) que contêm uma mutação no códon 12 do gene KRAS (foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio F12K do HAM contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutâneamente 5×10^6 células por camundongo (suspensas em 50% de matrizel) nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da

randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de controle ou uma combinação de 2C2 com anticorpos monoclonais cetuximab foi administrada intraperitonealmente. Para estudos de dependência de dose o 2C2 foi administrado em, 3, 10 e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg) e 2C2-YTE em 10 mg/kg. Para os estudos de combinação 2C2 e cetuximab foram cada um administrados em 10 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.7.2. Resultados.

[0358] 2C2 demonstrou eficácia antitumoral dose-dependente no modelo de xenoenxerto A549 NSCLC humano subcutaneamente desenvolvido em camundongos fêmeas sem pelos. A eficácia máxima de 91% de dTGI foi alcançada com 30 mg/kg de 2C2 administrado duas vezes por semana até o dia 33 (**Figura 25A**). 2C2 e 2C2-YTE fornecidos em 10 mg/kg exibiu eficácia antitumoral similar nesse modelo tumoral A549. Uma vez que o tratamento foi interrompido os tumores começaram a crescer na mesma taxa que os tumores em camundongos tratados com controle. O modelo de xenoenxerto A549 contém uma mutação KRAS e uma deleção LKB-1.

[0359] Cetuximab em 10 mg/kg sozinho não eficaz nesse modelo tumoral A549. Entretanto, a adição de cetuximab em 10 mg/kg no 2C2 também em 10 mg/kg resultou em eficácia antitumoral aditiva durante a

fase de tratamento comparado ao 2C2 sozinho. Além disso, o grupo de tratamento de combinação mostrou uma taxa de recrescimento mais lenta dos tumores após a cessação do tratamento (**Figura 25B**).

4.8. Estudos de Modelo de Xenoenxerto NSCLC Escamoso HARA-B Humano Subcutâneo

4.8.1. Método

[0360] As células HARA-B NSCLC escamosas humanas que expressam o gene RAS, HRG e pHER3 do tipo selvagem foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, 2,383 g/L de tampão HEPES, L. Glutamina, 1,5 g/L de Bicarbonato de Sódio, 110 mg/L de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo (suspensas em 50% de matriz) nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 227 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2-YTE foram administrados intraperitonealmente em 3, 10 e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg), o controle ocorreu em 30 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.8.2. Resultados.

[0361] 2C2-YTE demonstrou eficácia antitumoral dose-dependente

no modelo de xenoenxerto HARA-B NSCLC escamoso humano subcutaneamente desenvolvido em camundongos fêmeas sem pelos. A eficácia máxima de 64,6% de dTGI foi alcançada com 30 mg/kg de 2C2-YTE administrado duas vezes por semana até o dia 29 (**Figura 26**). 2C2-YTE fornecido em 10 mg/kg exibiu eficácia antitumoral similar a 30 mg/kg; entretanto, 2C2-YTE em 3 mg/kg não foi eficaz nesse modelo tumoral HARA-B. O modelo de xenoenxerto HARA-B contém um alelo RAS do tipo selvagem.

4.9. Estudos de Modelo de Xenoenxerto HT-29 CRC Humano Subcutâneo

4.9.1. Método

[0362] As células de carcinoma colorretal humanas HT-29 (ATCC No.HTB-38) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE e IgG1 de controle anticorpos monoclonais foram administrados intraperitonealmente. 2C2 foi administrado em 2, 10 e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg), enquanto 2C2-YTE foi administrado em 30 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

$$\text{volume tumoral} = \pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$$

para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento

comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.9.2. Resultados.

[0363] 2C2 mostrou eficácia antitumoral dose-dependente usando o modelo de xenoenxerto colorretal HT-29 humano subcutaneamente injetado em camundongos fêmea sem pelos. 30 mg/kg de 2C2 administrado duas vezes por semana foi maximamente eficaz em 56% dTGI durante a fase de tratamento (**Figura 27**). 2C2-YTE exibiu a mesma eficácia que 2C2 ambos fornecidos em 30 mg/kg. Uma vez que o tratamento foi interrompido os tumores cresceram na mesma taxa que os tumores de controle. O modelo de xenoenxerto HT-29 contém uma mutação BRAF. Cetuximab em 10 mg/kg sozinho não apresentou atividade antitumoral mensurável nesse modelo. A atividade de 30 mg/kg de 2C2 em combinação com cetuximab em 10 mg/kg foi indistinguível da atividade de 30 mg/kg de 2C2 sozinho no final do fase de tratamento (dados não mostrados). Isso indica que esse modelo tumoral CRC que expressa EGFR, que responde bem ao 2C2, não foi adicionalmente inibido por uma adição de 2C2-YTE ao cetuximab.

4.10. Estudos de Modelo de Xenoenxerto HCT-116 CRC Humano Subcutâneo

4.10.1 Método

[0364] As células de carcinoma colorretal HCT-116 Humanas foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab e IgG1 de controle anticorpos monoclonais foram administrados

intraperitonealmente. 2C2 foi administrado em 3, 10 e 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg) enquanto 2C2-YTE ocorreu em 30 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\square \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.10.2. Resultados.

[0365] 2C2 em diversas concentrações diferentes e 2C2-YTE em 10 mg/kg administrado duas vezes por semana exibiu eficácia antitumoral modesta no modelo de xenoenxerto colorretal HCT-116 humano subcutaneamente injetado em camundongos fêmea sem pelos (**Figura 28**). As eficácia máxima foi notada em 43% de dTGI para 2C2 em 10 mg/kg. O anticorpo monoclonal cetuximab anti-EGFR não apresentou eficácia em 10 mg/kg. O modelo de xenoenxerto HCT-116 contém uma mutação KRAS.

4.11. Estudos de Modelo de Xenoenxerto LOVO CRC Humano Subcutâneo

4.11.1. Método.

[0366] As células de carcinoma colorretal LOVO humanas (ATCC No.CCL-229) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio F12K do HAM contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4

a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab e IgG1 de controle anticorpos monoclonais foram administrados intraperitonealmente. 2C2 foi administrado em 10 ou 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg), 2C2-YTE e cetuximab foram administrados em 10 mg/kg e o controle em 30 mg/kg. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.11.2. Resultados

[0367] 2C2 em 30 mg/kg administrado duas vezes por semana alcançou a eficácia antitumoral de 48% de dTGI no modelo de xenoenxerto colorretal LOVO humano subcutaneamente desenvolvido em camundongos fêmeas sem pelos (**Figura 29**). 2C2, 2C2-YTE e cetuximab todos em 10 mg/kg tiverem eficácia comparável. O modelo de xenoenxerto LOVO contém uma mutação KRAS.

4.12. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Carcinoma de Próstata DU145 Humano Subcutâneo

4.12.1. Método.

[0368] As células de carcinoma de próstata DU145 Humanas (ATCC No.HTB-81) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio MEM contendo sais de Earle, l-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se

subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo (suspensas em 50% de matrizel) nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, MM e AMG anticorpos monoclonais foram administrados intraperitonealmente em 30 mg por quilograma de peso corporal. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.12.2. Resultados

[0369] O uso de um modelo de xenoenxerto câncer de próstata DU145 humano subcutaneamente desenvolvido em camundongos machos sem pelos 2C2 em 30 mg/kg administrado duas vezes por semana demonstrou eficácia antitumoral de 77% dTGI nesse modelo tumoral (**Figura 30**). O modelo de xenoenxerto DU145 contém uma deleção LKB-1. Os anticorpos monoclonais anti-HER3 AMG e MM usados em 30 mg/kg demonstraram eficácia antitumoral, porém, eles foram menos eficazes que o 2C2 na mesma dose de 30 mg/kg.

4.13. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Câncer de Mama BT-474 Humano Ortotópico

4.13.1. Método.

[0370] As células de câncer de mama BT-474 humanas foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de

soro fetal bovino. Os Xenoenxertos ortotópicos foram estabelecidos injetando-se 1×10^7 células por camundongo (suspensas em 50% de matrizel) na camada de gordura mamária no flanco direito de camundongos nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de idade. Péletes de estrogênio (0,36 mg) foram colocados sob a pele do flanco esquerdo 1-2 dias antes da injeção de células. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. Anticorpos 2C2, 2C2-YTE, e ou anti-HER2 conhecidos na técnica: MM, AMG e trastuzumab (nome comercial Herceptin®; por exemplo, Patente U.S. número 5.821.337) foram administrados intraperitonealmente em 30 mg por quilograma de peso corporal. Lapatinib foi administrado por gavagem oral em 100 mg por quilograma de peso corporal. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.13.2. Resultados

[0371] O uso de um modelo de câncer de mama humano acionado por HER2, BT-474, ortotopicamente injetado na camada de gordura mamária de camundongos fêmea sem pelos, a administração de 2C2 em 30 mg/kg injetado duas vezes por semana levou a um dTGI de 55% em xenoenxertos BT-474 (**Figura 31A**). HER2 expressa BT-474 em níveis muito altos de 3+ caracterizados por HercepTest. AMG e MM ambos administrados em 30 mg/kg não mostraram eficácia antitumoral

nesse modelo acionado por HER2.

[0372] Lapatinib é um fármaco de molécula pequena que inibe EGFR e HER2. Uma vez que os tumores BT-474 são acionados por HER2, lapatinib foi testado nesse modelo e descoberto por causar estase tumoral no modelo tumoral BT-474. O tratamento de combinação de 30 mg/kg de 2C2 com 100 mg/kg de lapatinib resultou na eficácia antitumoral aprimorada de lapatinib sozinho que foi mais claramente visível em um atraso no recrescimento dos tumores na ausência de tratamentos adicionais (**Figura 31B**). A atividade antitumoral de 2C2-YTE foi similar àquela do 2C2. O anticorpo trastuzumab anti-HER2 também foi testado nesse modelo e mostrou ser muito ativo nesse modelo de xenoenxerto acionado por HER2 com um dTGI de 111,6%. Houve pouco aprimoramento adicional na atividade de trastuzumab em 30 mg/kg através de uma adição de 30 mg/kg de 2C2 que mostrou um dTGI de 118,5% (**Figura 31C**).

[0373] A capacidade do clone 16 (o clone parental a partir do qual 2C2 foi derivado) para modular os marcadores farmacodinâmicos pHER3 e pAKT foi testada em extratos de xenoenxerto tumoral BT-474. Resumidamente, os camundongos fêmea atípicos sem pelos foram implantados ortotopicamente com células de câncer de mama BT-474 que expressam HER2 alto. Os animais foram administrados com Clone 16 em 30 mg/kg duas vezes em 48 horas. Os extratos foram preparados 24 horas depois para análise de pHER3, pAKT, e HER3 total (tHER3). Os resultados são normalizados para animais de controle tratados com PBS. Havia três animais por grupo de tratamento. Conforme mostrado na Figura 32, o Clone 16 inibiu a fosforilação tanto de HER3 como de AKT por 50,0% e 46,1%, respectivamente, comparados aos tumores a partir de camundongos tratados com PBS e nenhuma modulação de HER3 total foi observada pelo Clone 16.

4.14. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Câncer de Mama MCF-

7 Humano Ortotópico

4.14.1. Método

[0374] As células de câncer de mama MCF-7 Humanas foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio Optimem contendo glutamax, 2,4/L de bicarbonato de sódio, Hepes e 5% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos ortotópicos foram estabelecidos injetando-se 5 × 10⁶ células por camundongo (suspensas em 50% de matrizel) na camada de gordura mamária no flanco direito de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Péletes de estrogênio (0.36 mg) foram colocados sob a pele do flanco esquerdo 1-2 dias antes da injeção de células. Os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2, 2C2-YTE e trastuzumab anticorpos monoclonais foram administrados intraperitonealmente. 2C2 foi administrado em 10 ou 30 mg por quilograma de peso corporal (mg/kg) 2c2-YTE e trastuzumab em 10 mg/kg. Paclitaxel foi administrado intravenosamente em 10 mg por quilograma de peso corporal. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.14.2. Resultados

[0375] 2C2 em 10 mg/kg ou 30 mg/kg mostrou eficácia antitumoral modesta de 34% de dTGI em um modelo de xenoenxerto câncer de mama MCF-7 humano ortotopicamente injetado na camada de gordura

mamária de camundongos fêmea sem pelos. 2C2-YTE em 10 mg/kg apresentou eficácia similar ao 2C2 na mesma concentração (**Figura 33A**). Trastuzumab não demonstrou eficácia nesse modelo que expressa HER2 que indicou que HER2 não foi suficiente para acionar o crescimento tumoral. Os tumores MCF-7 expressaram baixos níveis de HER2 (1+) medidos por HercepTest.

[0376] Paclitaxel mostrou eficácia antitumoral clara no modelo de câncer de mama MCF-7 ortotópico quando dosado em 10 mg/kg a cada segundo dia durante dez dias. A adição de 10 mg/kg de 2C2 ao tratamento de paclitaxel aumentou a eficácia antitumoral de paclitaxel sozinho no final da fase de tratamento (**Figura 33B**). Os tumores recresceram na mesma taxa que o paclitaxel tratou os tumores após o tratamento ter sido interrompido.

4.15. Estudos de Modelo de Xenoenxerto de Câncer de mama MDA-MB-361 Humano Ortotópico

4.15.1. Método.

[0377] As células de câncer de mama MDA-MB-361 humanas foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos ortotópicos foram estabelecidos injetando-se 5×10^6 células por camundongo (suspensas em 50% de matrigel) na camada de gordura mamária no flanco direito de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Péletes de estrogênio (0,36 mg) foram colocados sob a pele do flanco esquerdo 1-2 dias antes da injeção de células. Os tumores foram permitidos a crescer até 230 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. Anticorpos 2C2-YTE, e/ou anti-HER2 conhecidos na técnica, em particular, trastuzumab (nome comercial Herceptin®; por exemplo, Patente U.S. número 5,821,337) e RhuMAb 2C4 (por exemplo, Publicação de Patente WO2001/00245) designados no presente

documento como trastuzumab e 2C4, respectivamente. Trastuzumab e anticorpos monoclonais 2C4 foram administrados intraperitonealmente em 30 mg por quilograma de peso corporal (2C2-YTE) ou em 10 mg por quilograma de peso corporal (trastuzumab e 2C4). Lapatinib foi administrado por gavagem oral em 100 mg por quilograma de peso corporal. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

4.15.2. Resultados

[0378] O uso de um modelo de câncer de mama humano acionado por HER2, MDA-MB-361 (Hercept test +2), ortotopicamente injetado na camada de gordura mamária de camundongos fêmea sem pelos, administração de 2C2-YTE em 30 mg/kg injetado duas vezes por semana para cinco doses levou a 70,1% de dTGI em xenoenxertos MDA-MB-361 (**Figura 34A-C**). As células MDA-MB-361 expressam HER2 em níveis médios de 2+ caracterizados por HercepTest e pontuação positiva através da análise FISH (análise de Hibridização Fluorescente in situ). Trastuzumab e rhuMAb 2C4 ambos administrados em 10 mg/kg e lapatinib em 100 mg/kg administrado duas vezes por dia também mostraram eficácia antitumoral no modelo tumoral MDA-MB-361.

[0379] Uma vez que os tumores MDA-MB-361 são acionados por HER2, 2C2-YTE foi combinado com fármacos que visam HER2, tais como, trastuzumab, rhuMAb 2C4 ou lapatinib. O tratamento de

combinação de 30 mg/kg de 2C2-YTE com 10 mg/kg de trastuzumab resultou em eficácia antitumoral aditiva comparada ao trastuzumab sozinho. Um efeito aditivo também foi visível em um atraso no recrescimento dos tumores na ausência de tratamentos adicionais (**Figura 34A**). A combinação de 2C2-YTE com trastuzumab foi mais bem comparada às combinações de 2C2-YTE com rhuMAb 2C4 (**Figura 34B**) ou lapatinib (**Figura 34C**) nesse modelo.

4.16. Camundongos Transgênicos que Expressam Receptor FcRn Humano para Estudar a Exposição dos Anticorpos à Modificação YTE.

4.16.1. Método.

[0380] Aos camundongos SCID fêmea transgênicos que expressam o receptor FcRn humano foi fornecida uma única dose de 60 mg/kg de Clone 16-GL, 2C2 ou 2C2-YTE através da via intravenosa. O soro foi coletado a partir desses camundongos em diversos pontos de tempo após dosagem por punção cardíaca e o sangue foi coletado em tubos microtainer SST. Os tubos foram gentilmente agitados por 10 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos para permitir que o soro coagule. As amostras foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 10 minutos, e as amostras de soro foram cuidadosamente transferidas para novos tubos e armazenadas a -80°C. Um formato de Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) foi usado para a determinação quantitativa de 2C2 em soro de camundongo. Os controles de qualidade padrões, e amostras de soro de camundongo foram incubados com anticorpos IgG anti-humano de cabra que foram imobilizados em uma placa de microtitulação de 96 poços. Após a incubação, materiais não ligados foram removidos através de uma etapa de lavagem e o 2C2 foi detectado usando um IgG anti-humano de cabra com conjugado com peroxidase de raiz-forte. Uma solução de paragem ácida foi adicionada e o grau de turnover enzimático do substrato foi determinado medindo-

se a absorbância a 450 nm. A absorbância medida era diretamente proporcional à concentração de 2C2 ou 2C2-YTE presente no soro de camundongo. Uma curva 2C2 ou 2C2-YTE padrão para o ensaio foi usada para interpolar a concentração das amostras de soro.

4.16.2. Resultados.

[0381] 2C2-YTE, que contém a mutação YTE na cadeia principal 2C2, mostrou níveis de exposição mais altos ao longo do tempo comparado ao 2C2 ou Clone 16-GL (**Figura 35**). Quatorze dias após a única dose de anticorpo nesses camundongos, o nível de exposição ao soro de 2C2-YTE foi acima de 100 µg/ml enquanto tanto 2C2 e como Clone 16-GL se encontraram abaixo de 1 µg/ml. Essa descoberta demonstrou que YTE pode estender a meia vida de 2C2-YTE comparado ao seu anticorpo parental 2C2.

4.17. Inibidor de MEK Induz a Expressão HER3 e em combinação com o Anticorpo Anti-HER3 mostra Eficácia Antitumoral Aditiva.

[0382] As mutações de KRAS (oncogene viral de sarcoma rato V-Ki-ras2 Kirsten) e BRAF (oncogene viral de sarcoma de murino v-raf B1) levaram a ativação constitutiva de sinalização EGFR através da via Ras/Raf/Mek/Erk oncogênica. A mutação Kras se encontra entre os eventos de mutação que ocorrem mais frequentemente em muitos tumores sólidos, especialmente, cânceres colorretais (CRC, 30-40%) e de pulmão (LC, 20-25%). A mutação Braf também ocorre em frequência relativamente alta em CRC (~15%). Devido a sua capacidade de ativar constitutivamente a via ERK, Kras e Braf mutantes foram mostrados por conferir resistência tumoral às terapias RTK, especialmente EGFR mAbs, tais como, Cetuximab e Panitumumab. Os efeitos de inibição da proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) na via HER3 em modelos CRC e LC foram examinados usando o inibidor MEK selumetinib (AstraZeneca, vide, por exemplo, WO03/077914 e WO2007/076245) sozinho ou em combinação com 2C2 (ou 2C2-YTE). Inúmeros modelos CRC e LC foram

examinados incluindo aqueles que abrigam um mut-Kras (por exemplo A549, LOVO) ou mut-Braf (por exemplo, HT-29, Colo205) ou um RAS do tipo selvagem (por exemplo, HARA-B, KNS-62).

4.17.1. Métodos.

[0383] Estudos de cultura celular: as células foram colocadas em placas em 10^5 por poço em placas de 24 poços e em meio contendo 10% de FBS inativado por calor e permitidas a atingir uma confluência de 80% ou mais antes do tratamento. 2C2 (10 µg/mL) ou anticorpo de controle, inibidor MEK selumetinib (1 ou 10 µM) ou uma combinação de 2C2 (10 µg/mL) e selumetinib (10 µM) foi preparada em meio completo. Os tratamentos foram aplicados seguindo a remoção de meio de plaqueamento. Após uma incubação de 24 horas em 5% de CO₂ a 37°C, as células foram lavadas uma vez com PBS gelado e, então, lisadas adicionando-se 60 µL de 2× dodecil sulfato de sódio (SDS) tampão de amostra (Invitrogen). As amostras foram aquecidas por 5 minutos e, então, arrefecidas em gelo por 2 minutos. As amostras foram analisadas por Western blotting basicamente conforme descrito acima (vide Exemplos, seção 2.4).

[0384] Estudos de Xenoenxerto: células A549 NSCLC Humanas (ATCC No. CCL-185) que contêm uma mutação no códon 12 do gene KRAS (foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio F12K do meio HAM contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5×10^6 células por camundongo (suspensas em 50% de matrigel) nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. As células de carcinoma colorretal HT-29 humanas (ATCC No. HTB-38) foram mantidas a 37°C in a 5% CO₂ incubador em meio RPMI 1640 contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente $5 \times$

10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. As células de carcinoma colorretal LOVO humanas(ATCC No. CCL-229) foram mantidas a 37°C em um incubador de 5% de CO₂ em meio F12K do HAM contendo 4,5 g/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. Os xenoenxertos foram estabelecidos injetando-se subcutaneamente 5 × 10^6 células por camundongo nos flancos direitos de camundongos nu/nu atípicos de 4 a 6 semanas de idade. Para todos os três modelo tumorais, os tumores foram permitidos a crescer até 200 mm³ antes da randomização para estudos de eficácia. 2C2-YTE ou IgG1 de controle foram administrados intraperitonealmente. Selumetinib foi administrado oralmente. Para os estudos de combinação 2C2-YTE e selumetinib foram administrados em 30 mg/kg ou 75 mg/kg, respectivamente. As medições de calibre foram usadas para calcular os volumes tumorais usando a fórmula:

volume tumoral = $\pi \div 6(\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{largura})$ para tumores desenvolvidos em camundongos. Os efeitos antitumorais são expressos como inibição de crescimento tumoral de porcentagem delta (TGI), que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{porcentagem delta TGI} = 1 - (\text{dT} \div \text{dC}) \times 100,\backslash$$

onde dT = alteração no volume tumoral médio no grupo de tratamento comparado ao valor na preparação, e dC = alteração no volume tumoral médio no grupo de controle comparado ao valor na preparação.

[0385] Preparação de lisados provenientes de tumores congelados: os camundongos foram humanamente eutanizados por meio de asfixia de CO₂ de acordo com nosso protocolo *in vivo* e os tumores foram excisados e transferidos para tubos de Matriz de Lise A. Foi adicionado um tampão de lise RIPA (500 µl) contendo coquetel inibidor de protease e coquetel inibidor de fosfatase estabelecidos como I e II, então, as amostras foram homogeneizadas com o uso de uma máquina de

Preparação Rápida. As amostras foram resfriadas em gelo por 30 minutos e submetidas a um ciclo de homogeneização adicional antes da clarificação por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os lisados clarificados foram transferidos para tubos de 1,5 ml frescos e foi medido o teor de proteína. Os lisados foram, então, armazenados a -80°C até a análise. As amostras foram analisadas por Western blotting basicamente conforme descrito acima (vide Exemplos, seção 2.4).

4.17.2. Resultados.

[0386] Conforme mostrado na Figura 36, os níveis de proteína pHER3 e total aumentaram após o tratamento com o inibidor de MEK selumetinib em células de câncer colorretal HT-29 cultivadas em cultura que expressa BRAF mutante e em células LOVO que expressam uma KRAS mutante (Figura 36, gráficos à esquerda e no meio respectivamente). Um aumento de HER3 também foi observado em células Colo205 que expressam mut-BRAF e em células DLD-1 e HCT, que expressam KRAS mutante (Figura 36, gráfico à direita e dados não mostrados), após o tratamento com selumetinib. O aumento ocorreu nas doses de 1 µM e 10 µM de selumetinib. A atividade de selumetinib foi confirmada pela redução em pERK em todas as linhas celulares nas doses de 1 µM e 10 µM. A inibição de MEK resultou em uma inibição de fosforilação de ERK.. O anticorpo anti-HER3, 2C2, inibiu o nível total e de pHER3 em células HT-29 e LOVO. 2C2 também diminui HER3 em células Colo205 e DLD-1. Além disso, o cotratamento de 2C2 com selumetinib bloqueou a indução de HER3 total e pHER3 por selumetinib em células HT-29, LOVO e DLD-1 (Figura 36, e dados não mostrados). Não poderia ser observado HER3 ou pHER3 em células de câncer colorretal SW480 que expressam KRAS mutante, em células não tratadas ou células tratadas com selumetinib.

[0387] Conforme mostrado na Figura 37A, o tratamento de combinação de 30 mg/kg de 2C2-YTE com 75 mg/kg de selumetinib

resultou em eficácia antitumoral aditiva em xenoenxertos de NSCLC A549 em comparação a selumetinib sozinho. Também foi visível um efeito aditivo em um atraso no recrescimento dos tumores na ausência de tratamentos adicionais (painel superior). A análise por Western blot de lisados de tumor provenientes de camundongos tratados com uma combinação de 30 mg/kg de 2C2-YTE com 75 mg/kg de selumetinib ao longo de um período de 4 dias mostrou que phospho-HER3 e phospho-ERK foram totalmente inibidos. Ambos os marcadores servem como leituras farmacodinâmicas para a ação de 2C2-YTE e selumetinib. Foram feitas constatações similares com os modelos de xenoenxerto de CRC HT-29 (**Figura 37 B**, painel superior e inferior) e LoVo (**Figura 37 C**, painel superior e inferior). Além disso, constatou-se que phospho-AKT era reduzido em lisados de tumor de HT-29 tratados com uma combinação de 30 mg/kg de 2C2-YTE com 75 mg/kg de selumetinib em comparação tratamentos simples (**Figura 37B**, painel inferior). O tratamento com selumetinib sozinho a 75 mg/kg leva a um aumento em phospho-HER3 nos extratos de tumor de LoVo que foi evitado em tumores tratados com uma combinação de 2C2-YTE e selumetinib (**Figura 37C**, painel inferior). Foram observados resultados similares em HARA-B (dados não mostrados).

[0388] Em cultura celular, foi observado que os níveis de proteína HER3 aumentavam em resposta ao inibidor de MEK ao longo da maioria dos modelos examinados, indicando que a trajetória de HER3 pode exercer uma função na resistência a inibidores de MEK. Em inúmeros estudos de modelo de xenoenxerto de CRC e LC ortotópico, foi observado que uma combinação de 2C2-YTE e selumetinib aumenta a eficácia antitumoral de qualquer agente sozinho. Esses dados encorajam o uso de 2C2 em combinação com um inibidor de MEK como selumetinib para intensificar a atividade antitumoral e evitar resistência.

4.18. Estudos Toxicológicos em Macaco Cinomolgo

4.18.1. Método

[0389] Vinte macacos cinomolgos do gênero masculino (*Macaca fascicularis*) foram divididos em quatro grupos (5 animais por grupos) e um total de cinco doses de controle de veículo ou 2C2-YTE a 10, 30 ou 120 mg/kg foram administradas. Os animais foram dosados uma vez por semana por meio de uma infusão IV de 5 minutos em um volume de dose mínima de 5 ml/kg. Três animais por grupo foram necropsiados no dia 32 (três dias após a administração de dose final no dia 29 da fase de dosagem) e dois animais por grupo foram necropsiados no dia 43 da fase de recuperação (quarenta e cinco dias após a administração de dose final no dia 29 da fase de dosagem). A avaliação de toxicidade se baseou em inúmeros fatores incluindo mortalidade, observações clínicas, pesos de corpo, classificação de irritação de sítio de dose e avaliações clínicas e anatômicas.

[0390] AS amostras de plasma de macaco cinomolgo foram isoladas e analisadas para níveis de HER3 solúvel (sHER3) com o uso de um formato de sanduíche de anti-HER3 com um sistema de detecção de eletroquimioluminescência (ECL) para quantificação de sHER3 livre. Placas de 96 poços não revestidas Meso Scale Discovery (MSD) (MSD, número de catálogo L15XA-6/L11XA-6) foram revestidas com 0,5 ug/ml de 2C2-YTE de um dia para o outro a 2 a 8 °C e, subsequentemente, bloqueadas com bloqueador de MSD A (MSD, número de catálogo R93BA-1). Os controles de Qualidade (QC) e Padrão de Referência e as amostras de teste não diluídas de plasma de macaco cinomolgo foram adicionadas a placas bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo anti-hErbB3/HER3 biotinilado (R&D Systems, número de catálogo BAM348) seguido pela adição de Sulfo-TAG (MSD, número de catálogo R32AD-1) resultou em emissão de luz quando estimulado eletroquimicamente. O sinal ECL foi capturado e registrado em um Imageador MSD Sector 2400. A quantidade de luz gerada está

diretamente correlacionada à quantidade de sHER3 nas amostras de plasma de macaco cinomolgo. Os dados brutos (contagens de ECL) foram exportados para SOFTmax® PRO. A curva padrão para padrões de HER3 humano recombinante foi ajustada com o uso de um programa de ajuste de 5 parâmetros. As concentrações de HER3 de plasma de macaco cinomolgo foram calculadas com base na curva padrão com o uso da função estatística de SOFTmax PRO.

[0391] Além disso, as amostras de biópsia de pele foram coletadas para análise biológica. Resumidamente, foram desenhados círculos de 10 mm correspondentes na pele no animal e ~100 µl de PBS ou HRG a 0,1 mg/ml foi injetado intradermicamente no centro de cada círculo. Aproximadamente 20 minutos depois, uma amostra de pele foi coletada de cada sítio de injeção e congelada rapidamente. Alternativamente, as amostras de biópsia correspondentes são coletadas (sem injeção intradérmica prévia) de cada um e incubadas por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente em meio de cultura com ou sem 100 µg/ml de HRG seguido por duas lavagens com PBS gelado. A amostra lavada é, então, rapidamente congelada. Os tecidos foram, então, homogeneizados em tubos de Matriz de Lise A (MP Biomedicals) contendo tampão de lise RIPA e coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich) e coquetel inibidor de fosfatase estabelecidos I e II (EMD-Millipore) com o uso de uma máquina de Preparação Rápida (MP Biomedicals). As amostras foram, então, submetidas a um ciclo de congelamento rápido e a um ciclo de homogeneização adicional antes da clarificação por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Os lisados clarificados foram transferidos para tubos de 1,5 ml frescos e foi medido o teor de proteína. Os níveis de HER3 total e pHER3 são determinados com o uso de um ensaio ELISA sanduíche.

4.18.2 Resultados

[0392] Foi realizado um estudo de toxicidade de dose de repetição

de 1 mês de não GLP de 2C2-YTE com uma fase de recuperação de seis semanas em macacos cinomolgos para avaliar a toxicidade e a atividade de 2C2-YTE, quando administrada uma vez por semana por meio de infusão IV em macacos cinomolgos por pelo menos 1 mês (total de 5 doses) e para avaliar a reversibilidade, persistência ocorrencia atrasada de qualquer efeito após um período de recuperação de 6 semanas. Não foram observados efeitos adversos após administração IV uma vez por semana (infusão de 5 minutos) de até 120 mg/kg/dose de 2C2-YTE, por 5 semanas (total de 5 doses), em macacos cinomolgos do gênero masculino.

[0393] A capacidade de 2C2-YTE de bloquear pHER3 induzido por HRG na pele de macacos cinomolgos foi confirmada por avaliações *in vivo* e *ex vivo*. A supressão completa de HER3 solúvel de circulação foi observada em todos os animais que receberam 2C2-YTE intravenoso. O estímulo *ex vivo* de biópsias de pele com HRG resultou em um aumento na razão pHER3:tHER3, demonstrando que o HER3 presente na pele de macacos cinomolgos pode ser ativado por HRG, o ligante predominante para HER3. A supressão completa de pHER3 induzido por HRG foi alcançada em todos os grupos tratados com 2C2-YTE no final da fase de dosagem (dados não mostrados). Deste modo, 2C2-YTE bloqueou fosforilação de HER# induzido por HRG *in vivo* e *ex vivo* em amostras de biópsia de pele de macaco cinomolgo.

INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA

[0394] Todas as publicações e patentes mencionadas no presente documento estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade como se cada publicação ou patente individual fosse indicada de maneira específica e individualmente para ser incorporada a título de referência. Além disso, os Pedidos Provisórios N^{os} U.S. 61/563.092 depositado 23 de novembro de 2011; 61/656.670 depositado 7 de junho de 2012; e 61/722.558 depositado 5 de novembro de 2012, estão

incorporados a título de referência em sua totalidade para todas as finalidades.

[0395] A descrição anterior dos aspectos específicos irá, dessa forma revelar totalmente a natureza geral da invenção que outros podem, por meio de aplicação de conhecimento dentro do conhecimento da técnica, prontamente modificar e/ou adaptar para várias aplicações tais aspectos específicos, sem experimentação indevida, sem que se distancie do conceito geral da presente invenção. Portanto, tais adaptações e modificações se destinam a estarem dentro do significado e faixa de equivalentes dos aspectos revelados, com base nos ensinamentos e orientação apresentados no presente documento. Deveria ser entendido que a fraseologia ou a terminologia no presente documento serve ao propósito de descrição e não de limitação, de modo que a terminologia ou a fraseologia do presente relatório descriptivo deva ser interpretada pelo versado à luz dos ensinamentos e orientação.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo que se liga especificamente a HER3, **caracterizado** por pelo fato de que a VL compreende SEQ ID NO: 3 e em que a VH compreende uma SEQ ID NO: 2

2. Anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por pelo fato de que compreende um anticorpo.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme definido na reivindicação 2, **caracterizado** por pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada, em que a região constante de cadeia pesada é uma região constante IgG selecionada a partir de uma região constante de IgG1 humana, uma região constante de IgG2 humana, uma região constante de IgG3 humana e uma região constante de IgG4 humana.

4. Anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme definido na reivindicação 2, **caracterizado** por pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia leve, selecionada do grupo que consiste em uma região constante kappa humana e uma região constante lambda humana.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme definido na reivindicação 3 ou 4, **caracterizado** por pelo fato de que compreende (i) um anticorpo de cadeia leve compreendendo um anticorpo VL compreendendo SEQ ID NO: 3 e uma região constante de cadeia leve lambda humana, e (ii) um anticorpo de cadeia pesada compreendendo um anticorpo VH compreendendo SEQ ID NO:2 e uma região constante de cadeia pesada IgG1 humana, em que a região constante de cadeia pesada IgG1 humana compreende substituições de aminoácido relação a um domínio constante humano de IgG tipo selvagem nas posições 252, 254 e 256 em que a numeração está de

acordo com o índice EU apresentado em Kabat, em que há:

(a) substituição do aminoácido na posição 252 (metionina) por tirosina (Y),

(b) substituição do aminoácido na posição 254 (serina) por treonina(T), e

(c) substituição do aminoácido na posição 256 (treonina) por ácido glutâmico (E).

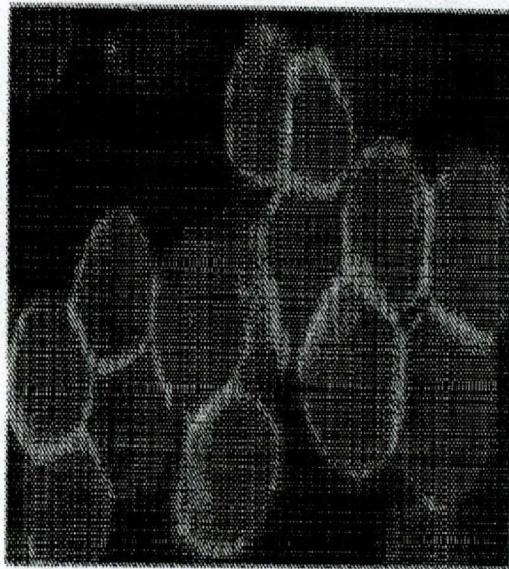
6. Composição, **caracterizada** por compreender o anticorpo conforme definido em uma das reivindicações 2 a 5 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

7. Uso do anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme definido em quaisquer das reivindicações 2 a 5, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para inibir a proliferação de uma célula que expressa HER3, em que a célula que expressa HER3 é uma célula tumoral humana do pescoço e da cabeça, célula cancerígena pulmonar de células humanas não pequenas, uma célula tumoral colo retal humana, uma célula tumoral de próstata humana ou uma célula cancerígena de mama humana.

8. Uso do anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme definido em quaisquer das reivindicações 2 a 5, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar câncer em um indivíduo.

9. Uso do anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo conforme definido na reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer gástrica, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço e melanoma e em que opcionalmente, o câncer compreende células que compreendem uma mutação de KRAS.

T: 0



T: 2.5 hrs.

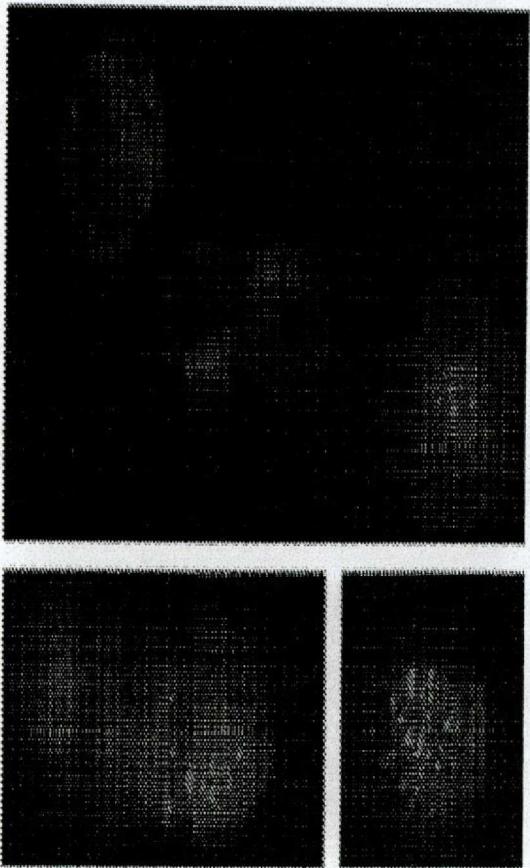


Fig. 1

Kabat #	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27 ^a	28			
CL16 (original)	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I		
CL16 (GL)	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	
5H6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	
8A3	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	
4H6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	R	G	S	S	N	I	
6E.3	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	L	S	N	I
2B11	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	
2D1	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	
3A6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N	I
4C4	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N	I

CDR1

Kabat #	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
CL16 (original)	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
CL16 (GL)	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
5H6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
8A3	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
4H6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
6E.3	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
2B11	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
2D1	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
3A6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V
4C4	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V

CDR2

Fig. 2A PARTE 1

Kabat #	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
CL16 (original)	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
CL16 (GL)	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
5H6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
8A3	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
4H6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
6E.3	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
2B11	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
2D1	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
3A6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		
4C4	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	A	D	Y	C		

Kabat #	89	90	91	92	93	94	95 ^a	95 ^b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
CL16 (original)	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
CL16 (GL)	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
5H6	A	A	W	D	D	G	L	P	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
8A3	A	A	W	D	D	S	L	I	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
4H6	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
6E.3	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2B11	A	A	W	D	D	S	L	P	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2D1	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
3A6	A	A	W	D	D	S	P	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
4C4	A	A	W	D	D	S	L	R	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L

CDR3

Fig. 2A
PARTE II

Kabat #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CL16 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	
15D12.1 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	
15D12.2 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	S	
Kabat #	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52 ^a	53	54	55	56	57	58	59	
CL16 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y
15D12.1 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y
15D12.2 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	N	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y
	CDR1														CDR2															

Fig. 2B PARTE I

Kabat #	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82a	82b	82c	83	84	85
---------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	----	----	----

CL16 VH	Y	A	D	S	V	K	G	R	E	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	E
---------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

15D12.1 VH	Y	A	D	S	V	K	G	R	E	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	E
------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

15D12.2 VH	<u>Y</u>	A	D	S	V	K	G	R	E	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	E
------------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Kabat #	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	a	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
---------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CL16 VH	D	T	A	V	V	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S
---------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

15D12.1 VH	D	T	A	V	V	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S
------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

15D12.2 VH	D	T	A	V	V	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S
------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

CDR3

Fig. 2B PARTE II

Kabat #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27 ^a	27 ^b
CL16 (original)	Q	Y	E	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	S	V	T	M	S	C	S	G	S	S	N
CL16 (GL)	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N
1A4	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N
2C2	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	I	N
3E.1	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	R	G	S	S	N
2F10	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N
2B11	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N

CDR1

Kabat #	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
CL16 (original)	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	H	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
CL16 (GL)	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
1A4	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
2C2	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
3E.1	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
2F10	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	
2B11	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	

CDR2

Fig. 2C
PARTE I

Kabat #	57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85
CL16 (original)	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
CL16 (GL)	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
1A4	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
2C2	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
3E.1	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
2F10	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D
2B11	G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D

Kabat #	86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 ^a 95 ^b 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
CL16 (original)	Y Y C A A W D D S L S G E V F G G G T K L T V L
CL16 (GL)	Y Y C A A W D D S L S G E V F G G G T K L T V L
1A4	Y Y C A A W D D S P P G E A F G G G T K L T V L
2C2	Y Y C A A W D D S P P G E A F G G G T K L T V L
3E.1	Y Y C A A W D D S P P G E A F G G G T K L T V L
2F10	Y Y C A A W D D S P S G E A F G G G T K L T V L
2B11	Y Y C A A W D D S L P G E V F G G G T K L T V L

CDR3

Fig. 2C PARTE II

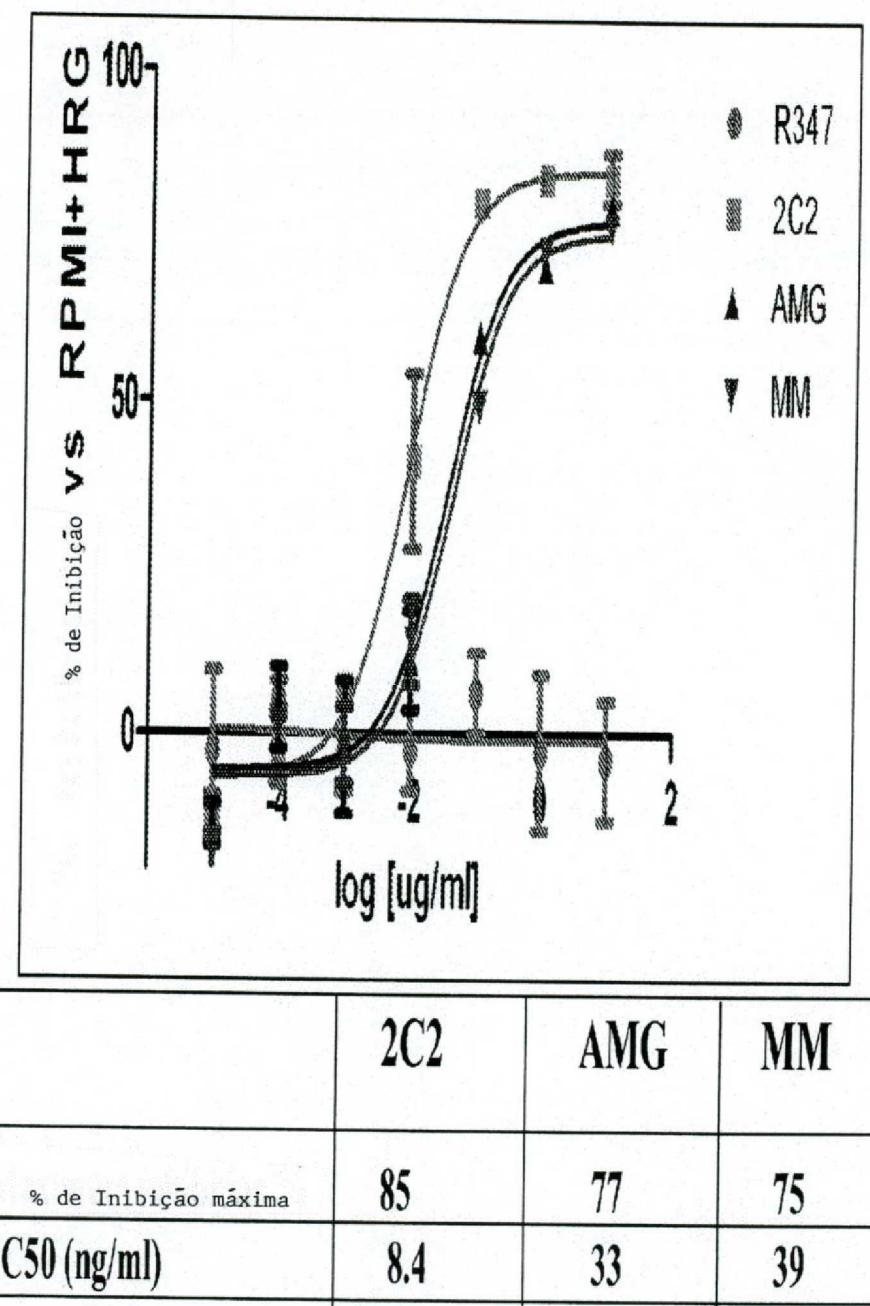
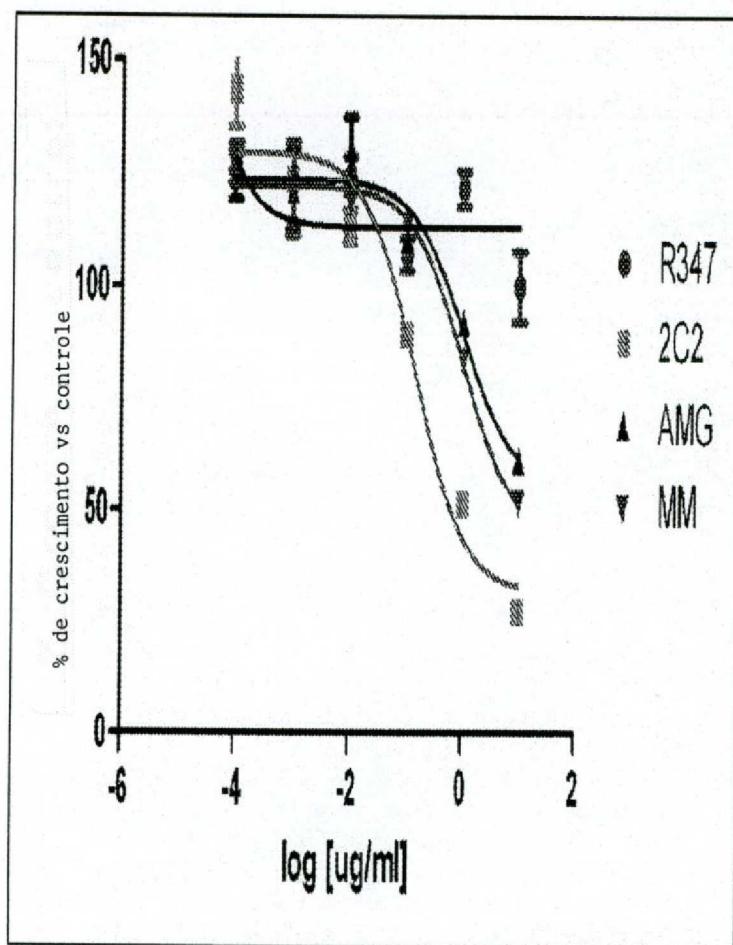


Fig. 3



	2C2	AMG	MM
% de Inibição máxima	72	39	49
IC50 (ug/ml)	0.14	0.99	0.95

Fig. 4

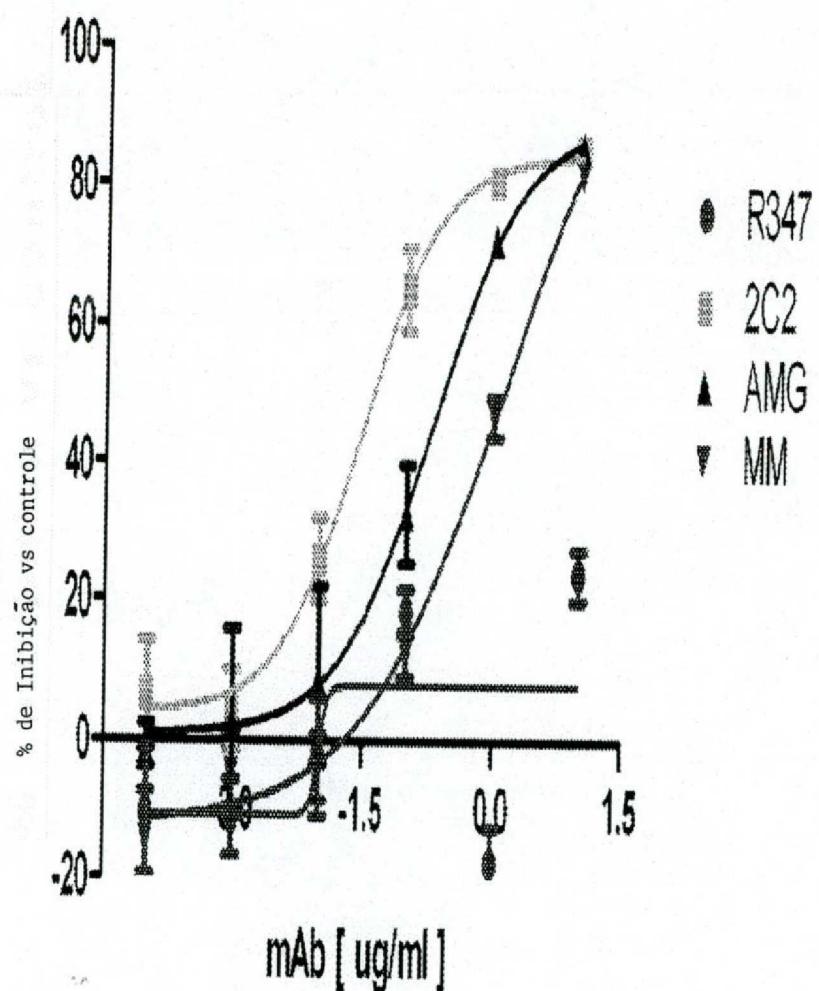


Fig. 5

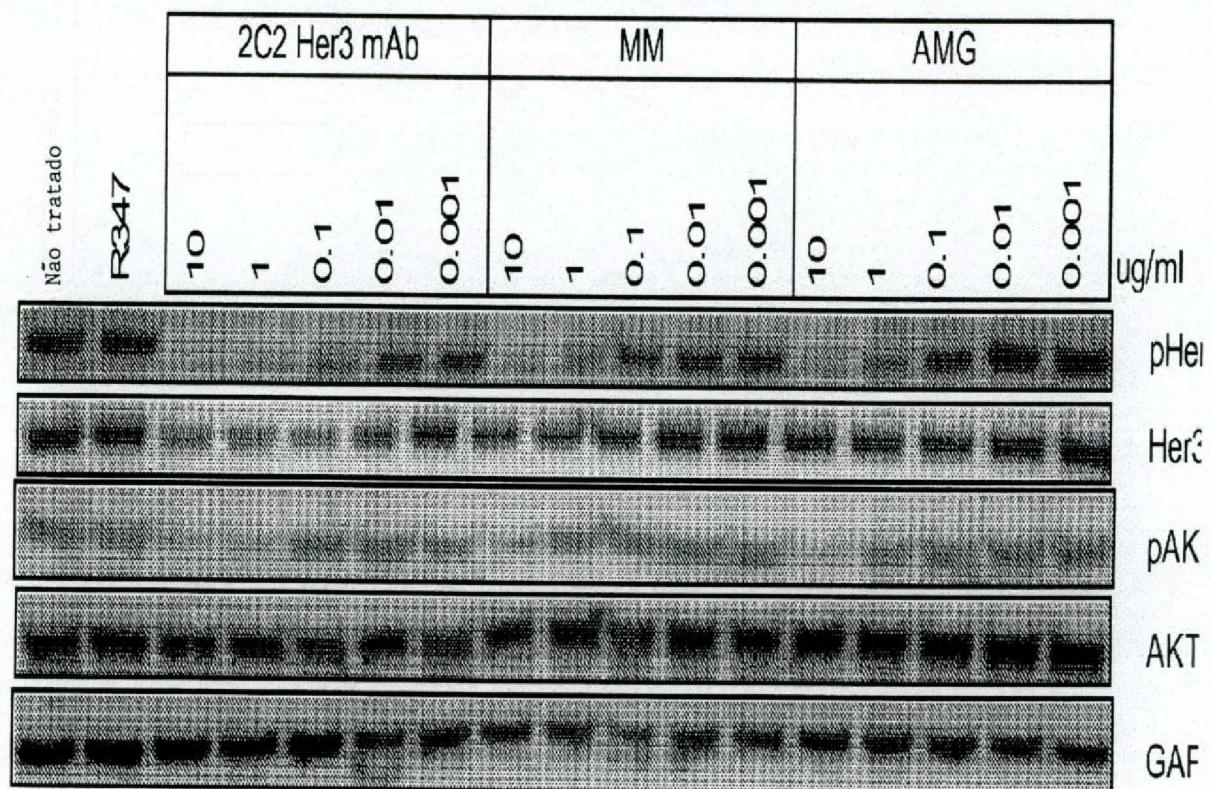


Fig. 6

A549

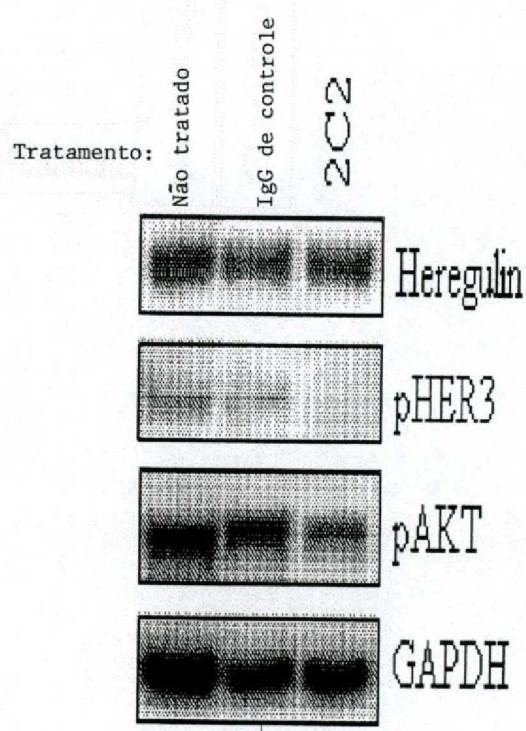
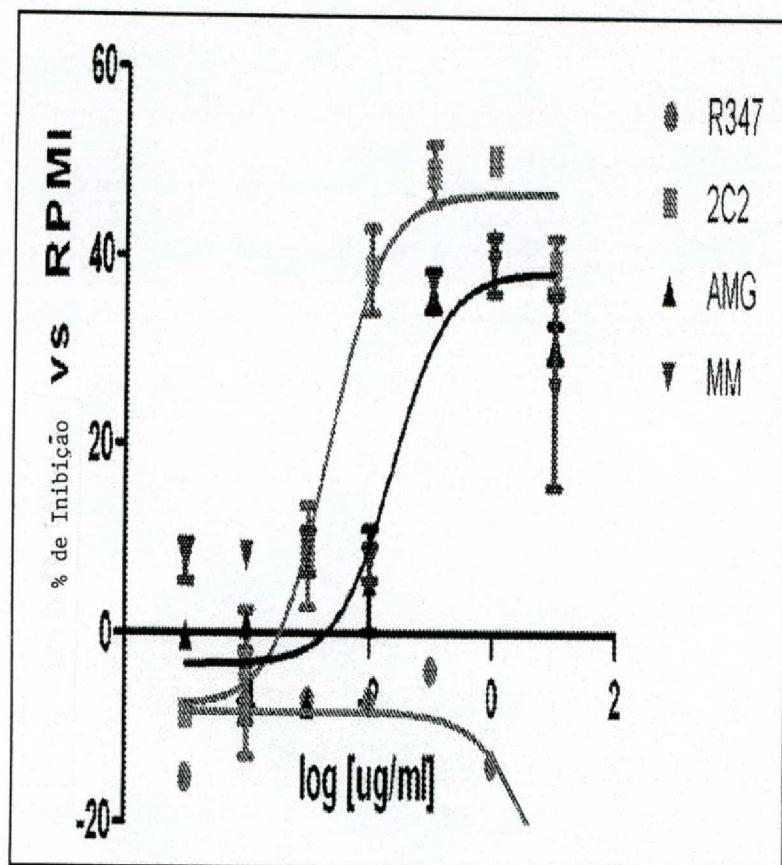
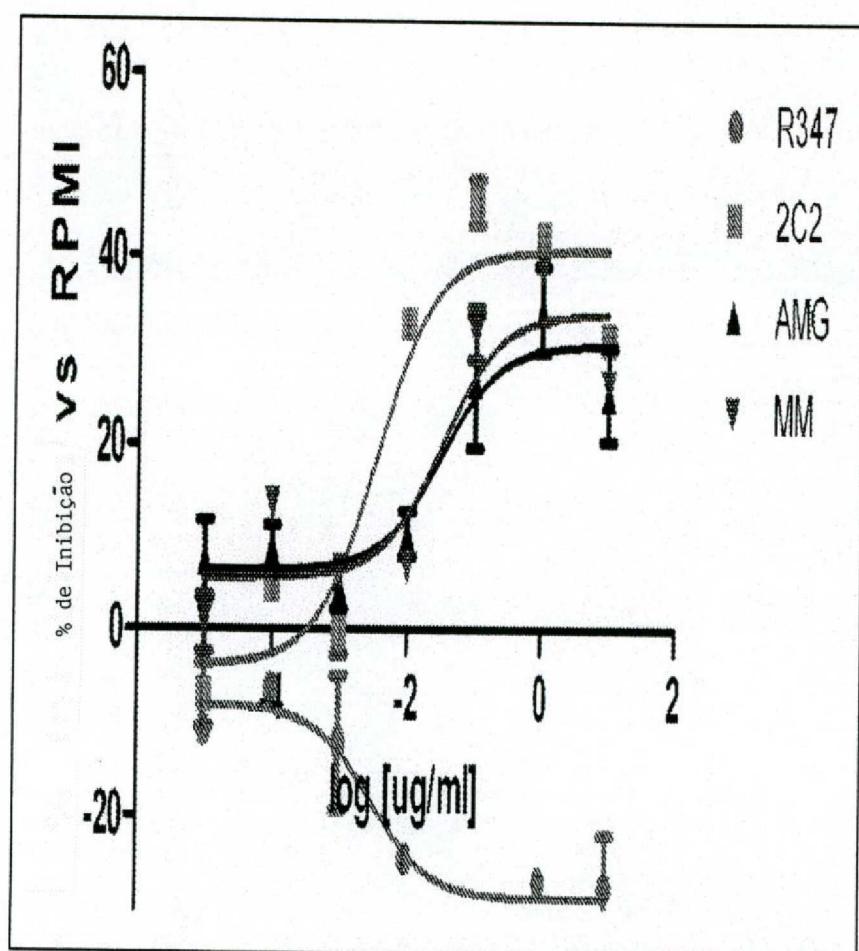


Fig. 7



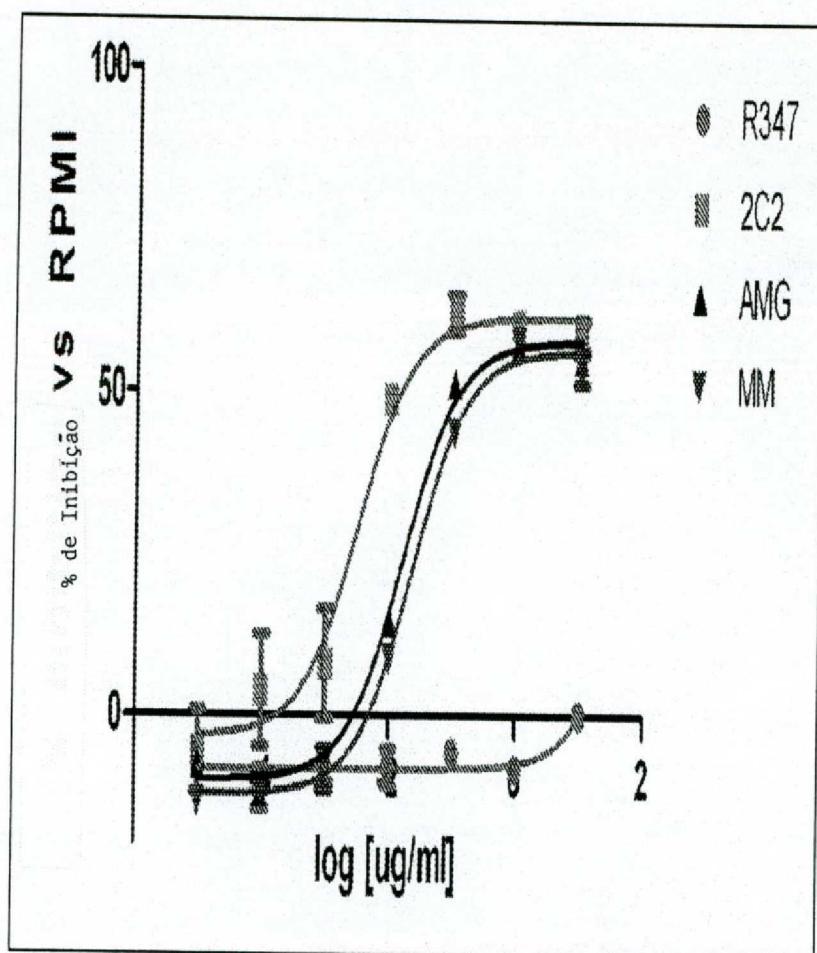
	2C2	AMG	MM
% de Inibição máxima	54	41	
IC50 (ng/ml)	2	23	

Fig. 8A



	2C2	AMG	MM
% de Inibição máxima	45	24	28
IC50 (ng/ml)	3.5	31	32

Fig. 8B



	2C2	AMG	MM
% de Inibição máxima	62	58	57
IC50 (ng/ml)	3.2	16.1	22.1

Fig. 8C

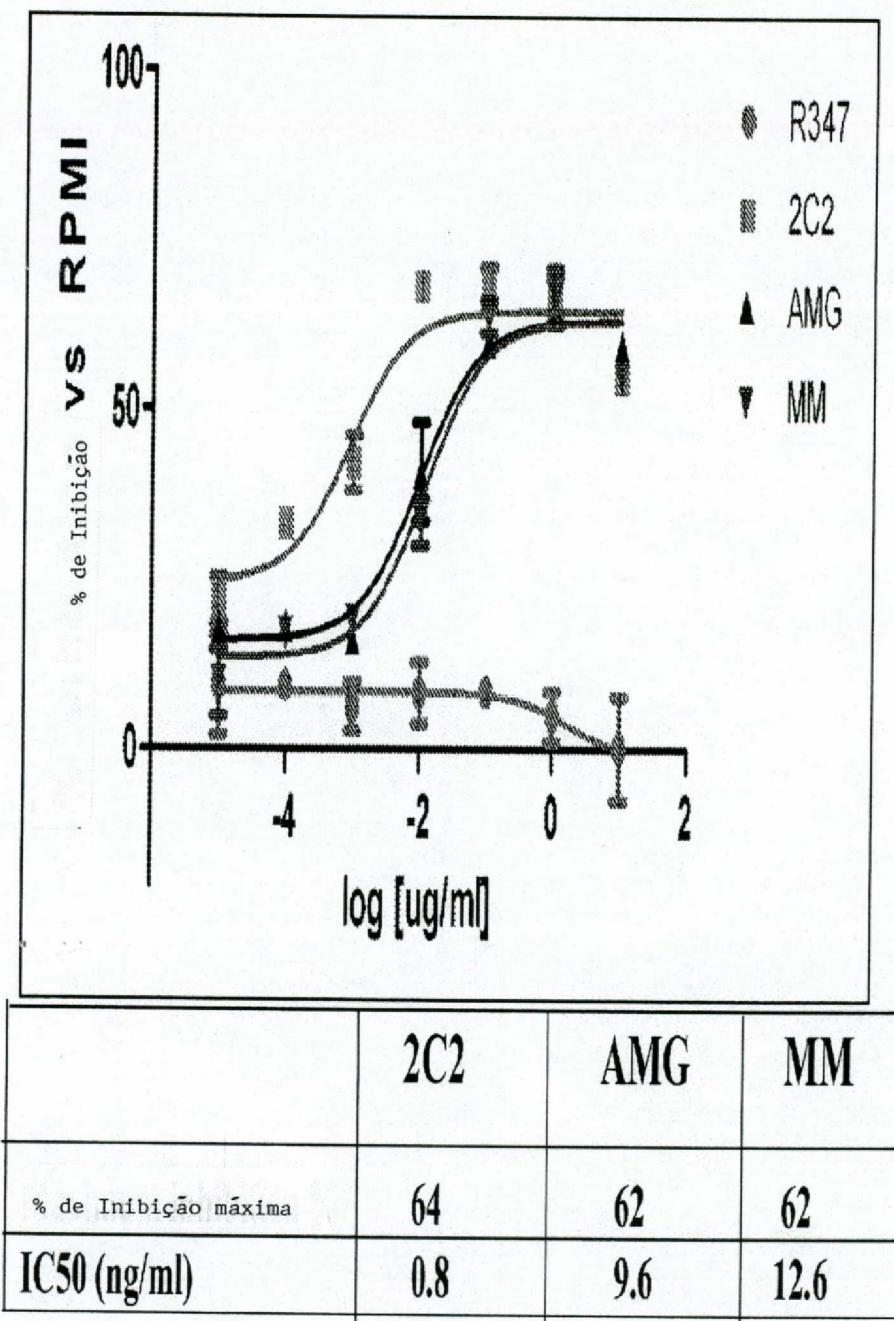
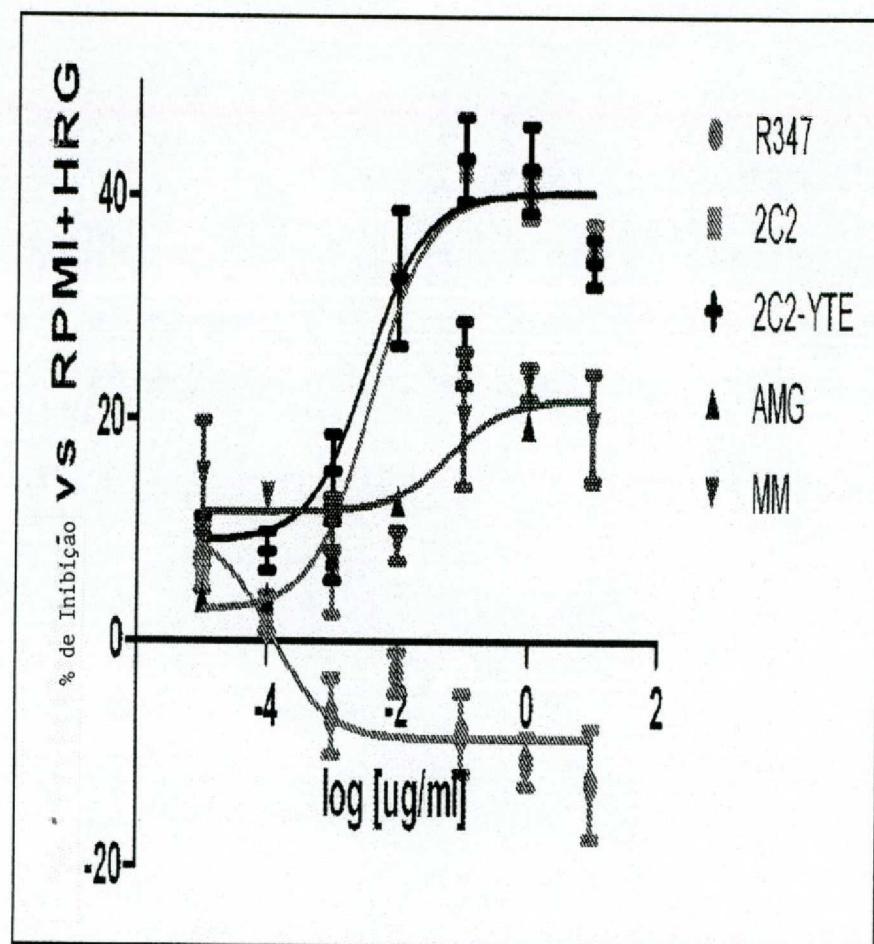


Fig. 8D



	2C2	AMG	MM
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	0.004	>10	>10
% de Inibição máxima	41		

Fig. 8E

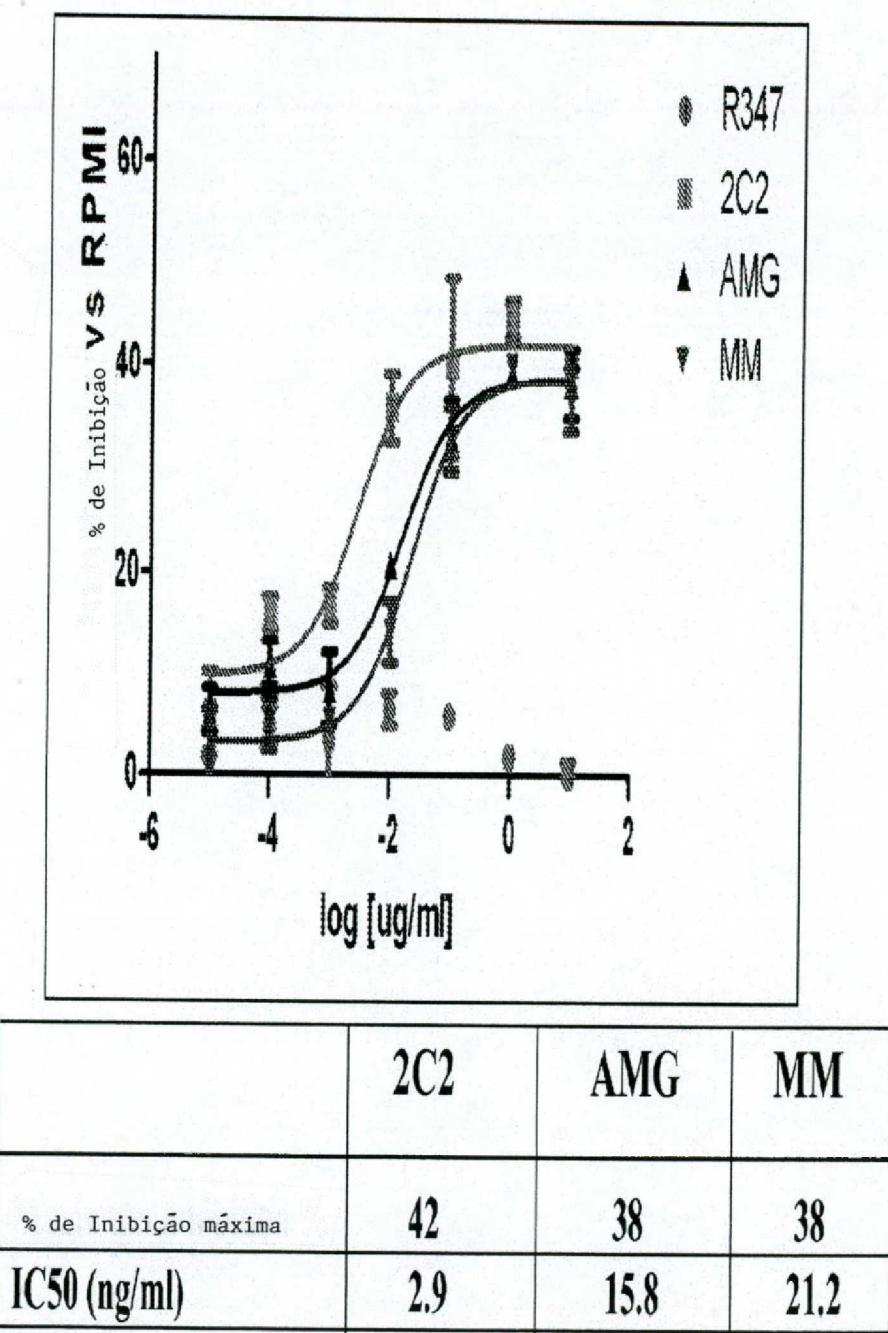
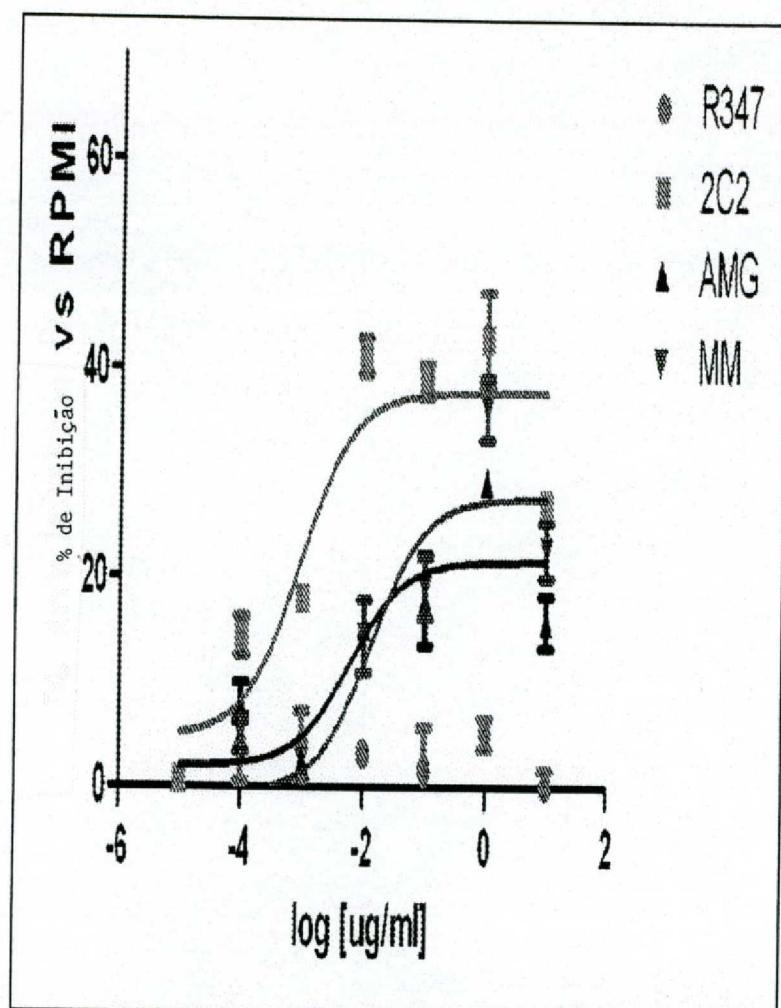
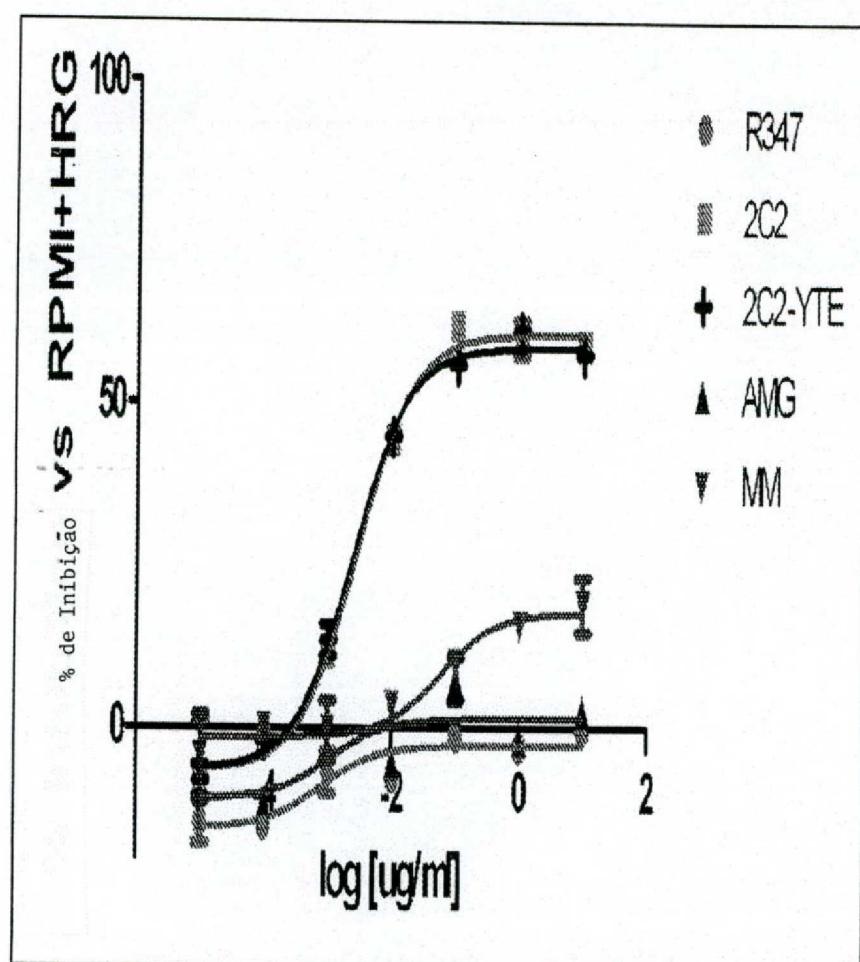


Fig. 9A



	2C2	AMG	MM
% de Inibição máxima	38	22	28
IC50 (ng/ml)	0.9	6.2	13.6

Fig. 9B



	2C2	AMG	MM
IC50 (ug/ml)	0.003	>10	>10
% de Inibição máxima	60	1	17

Fig. 9C

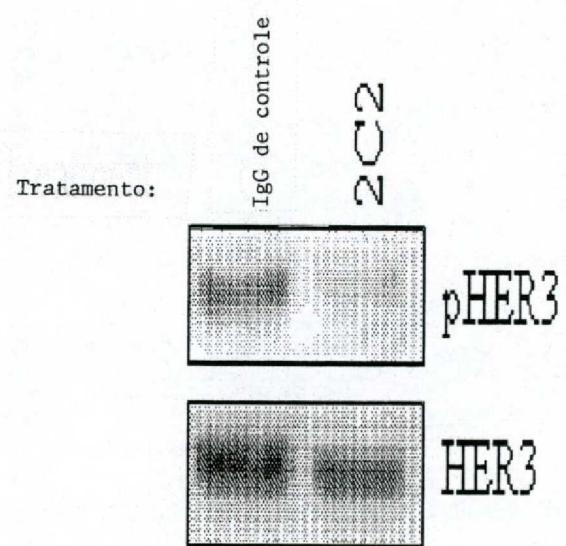
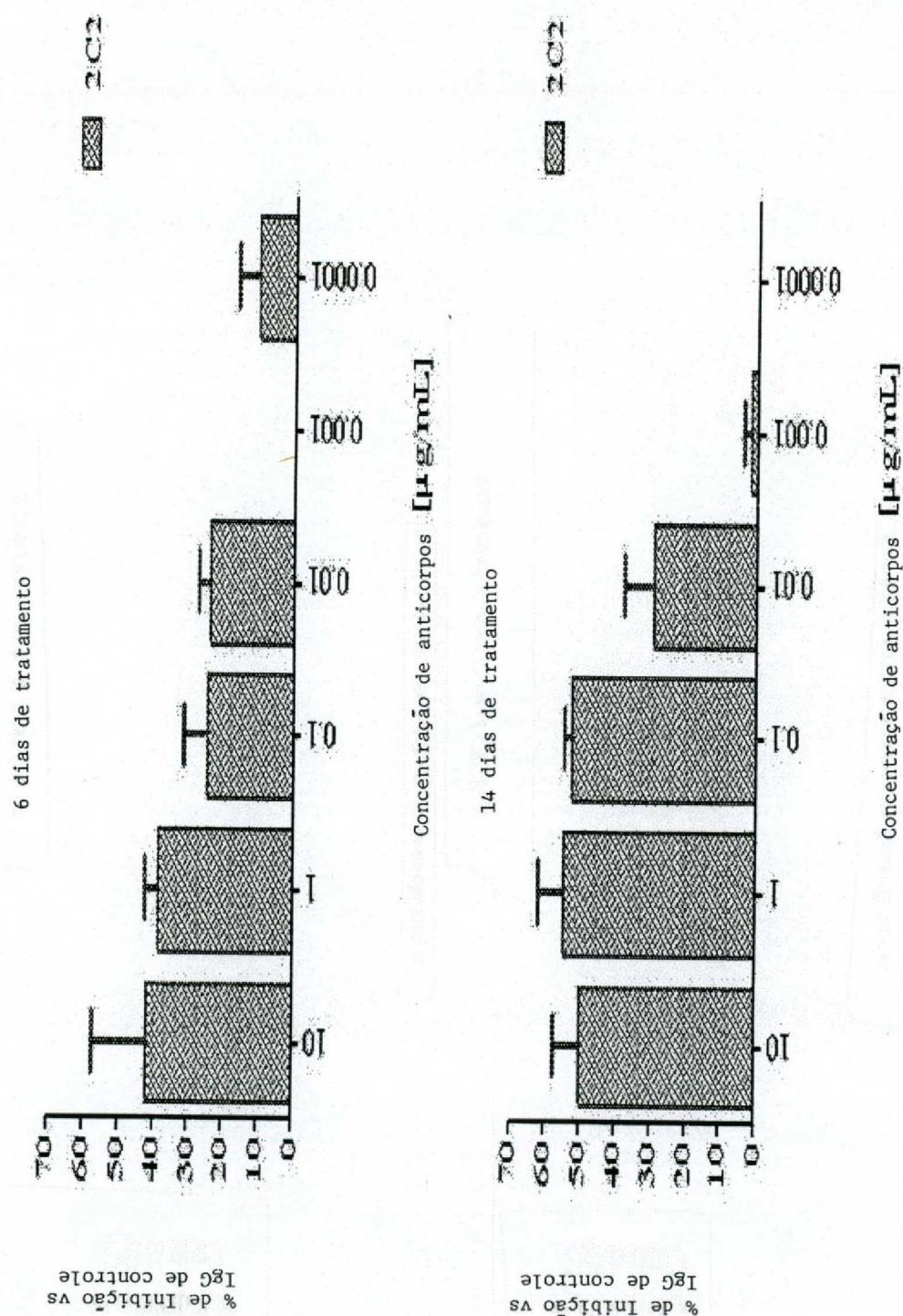


Fig. 10A



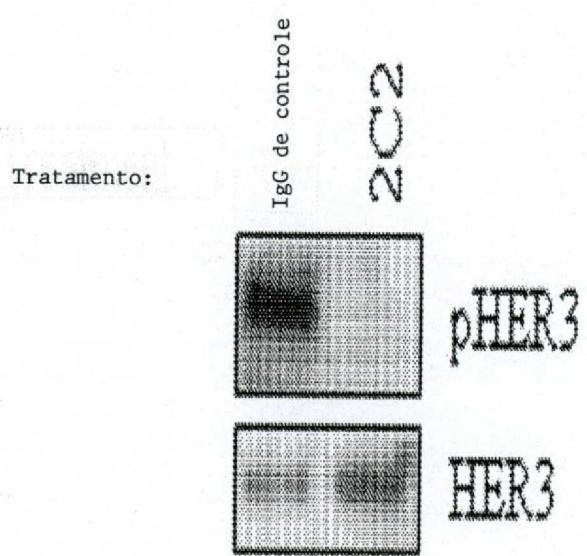


Fig. 11

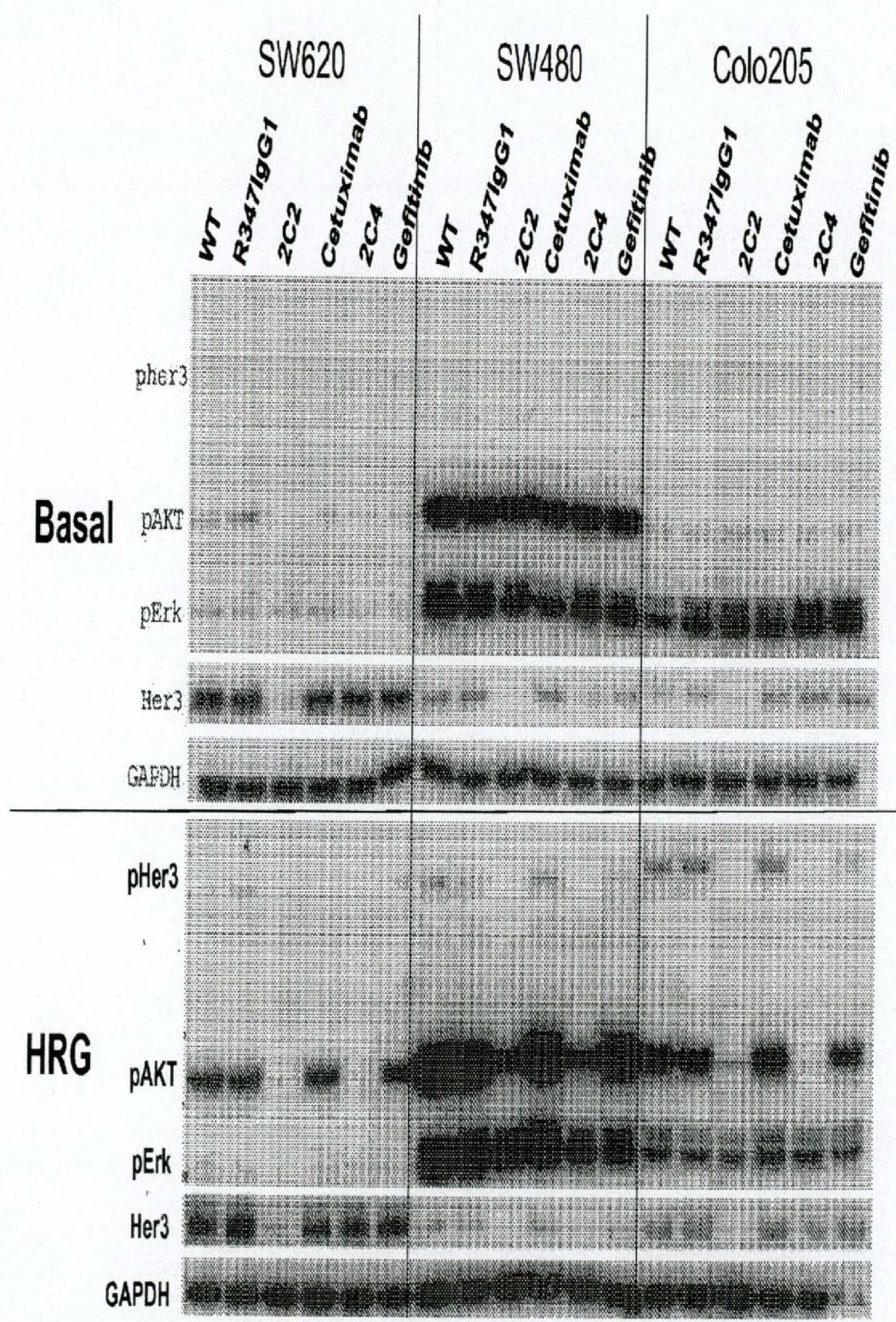


Fig. 12A

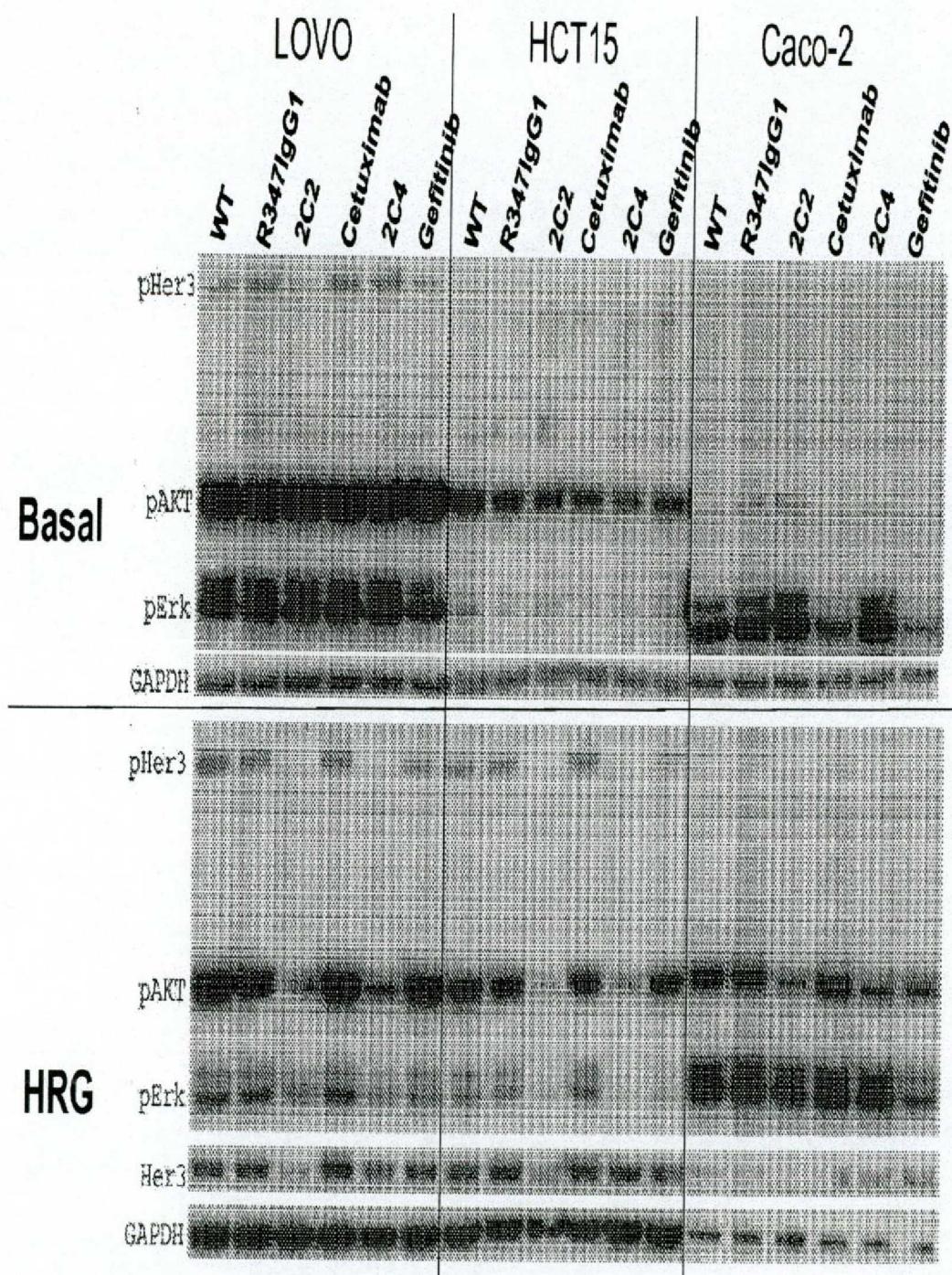


Fig. 12B

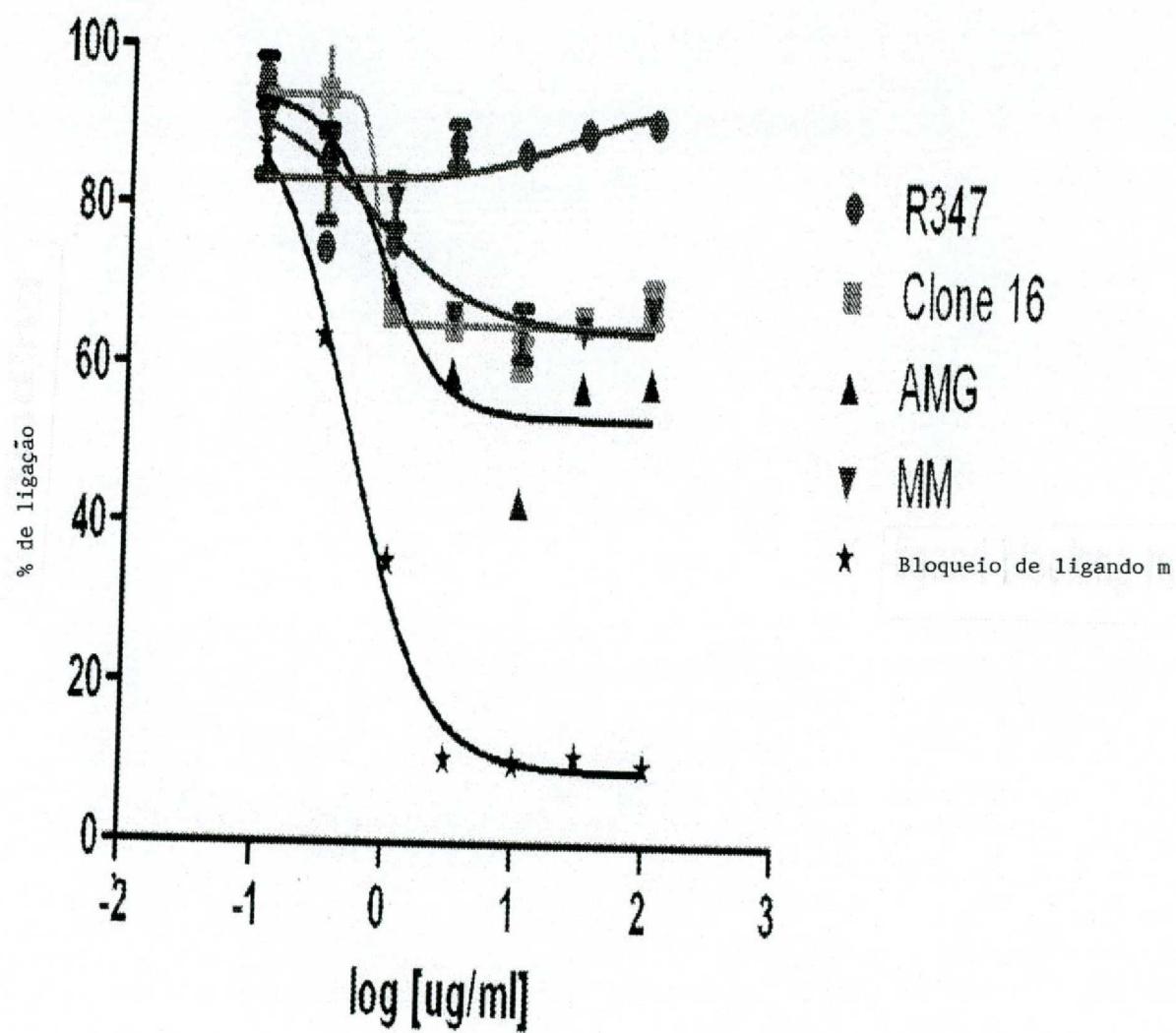


Fig. 13

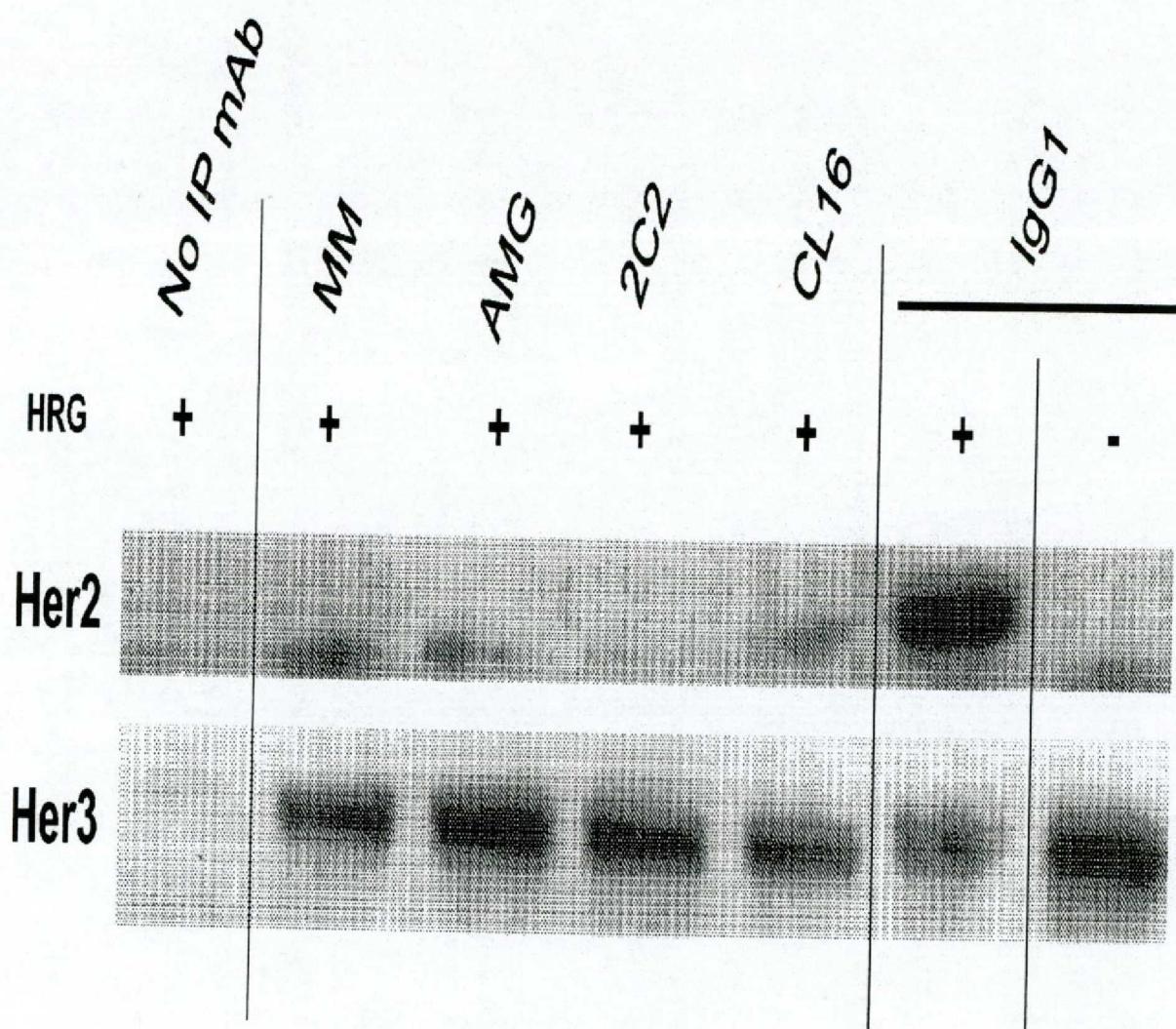


Fig. 14A

R347

R347

CL16

2C2

+ DTSSP

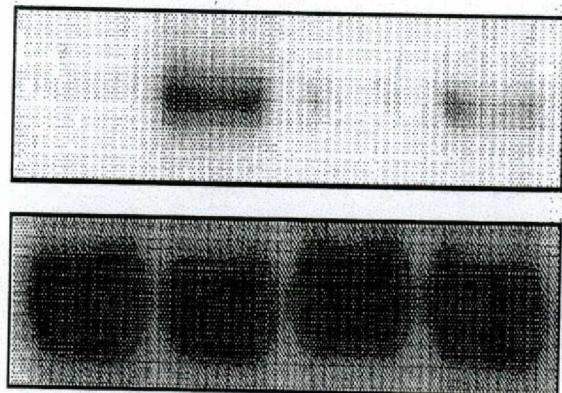
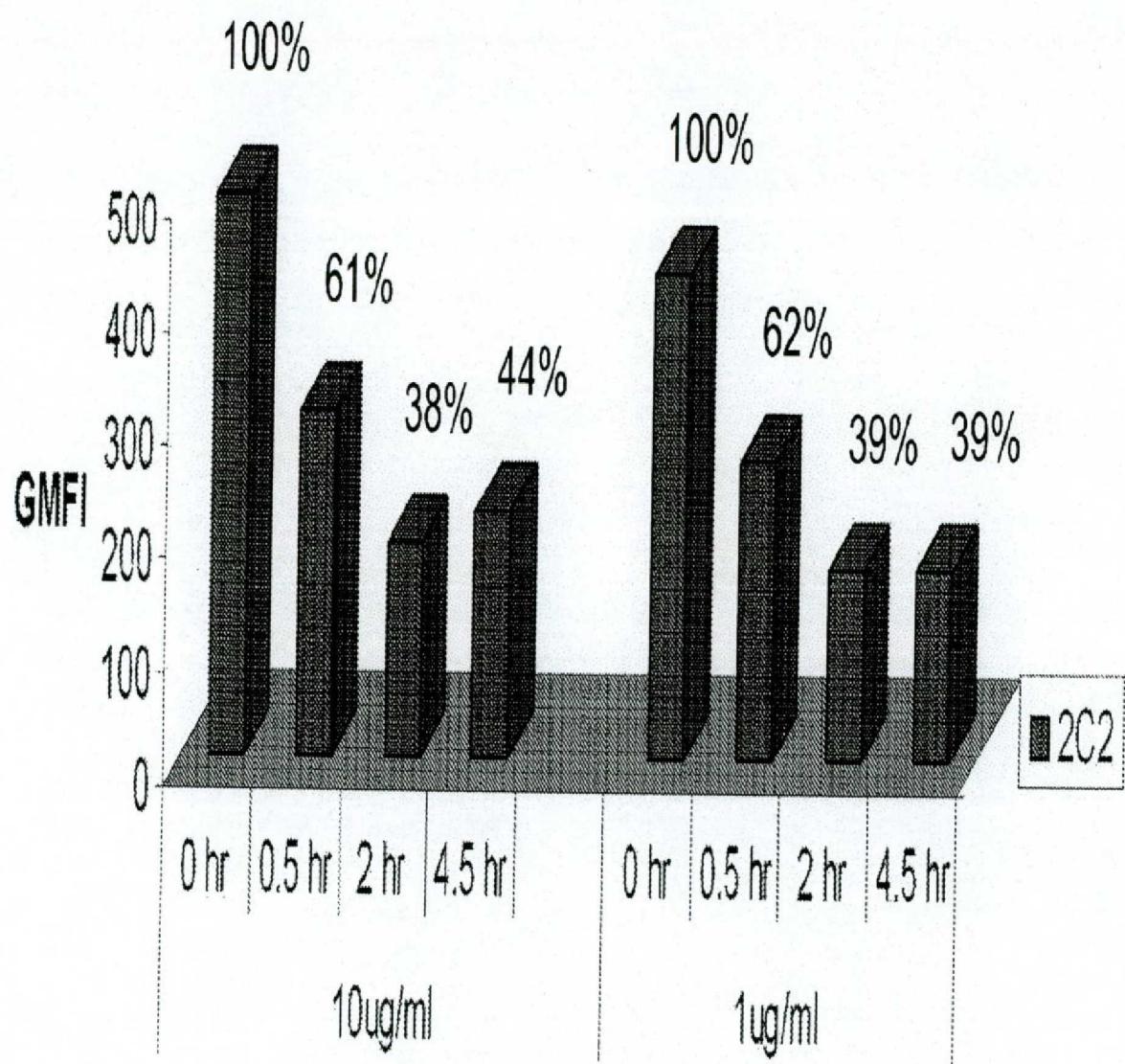


Fig. 14B



Curso de tempo e concentrações de mAb

Fig. 15A

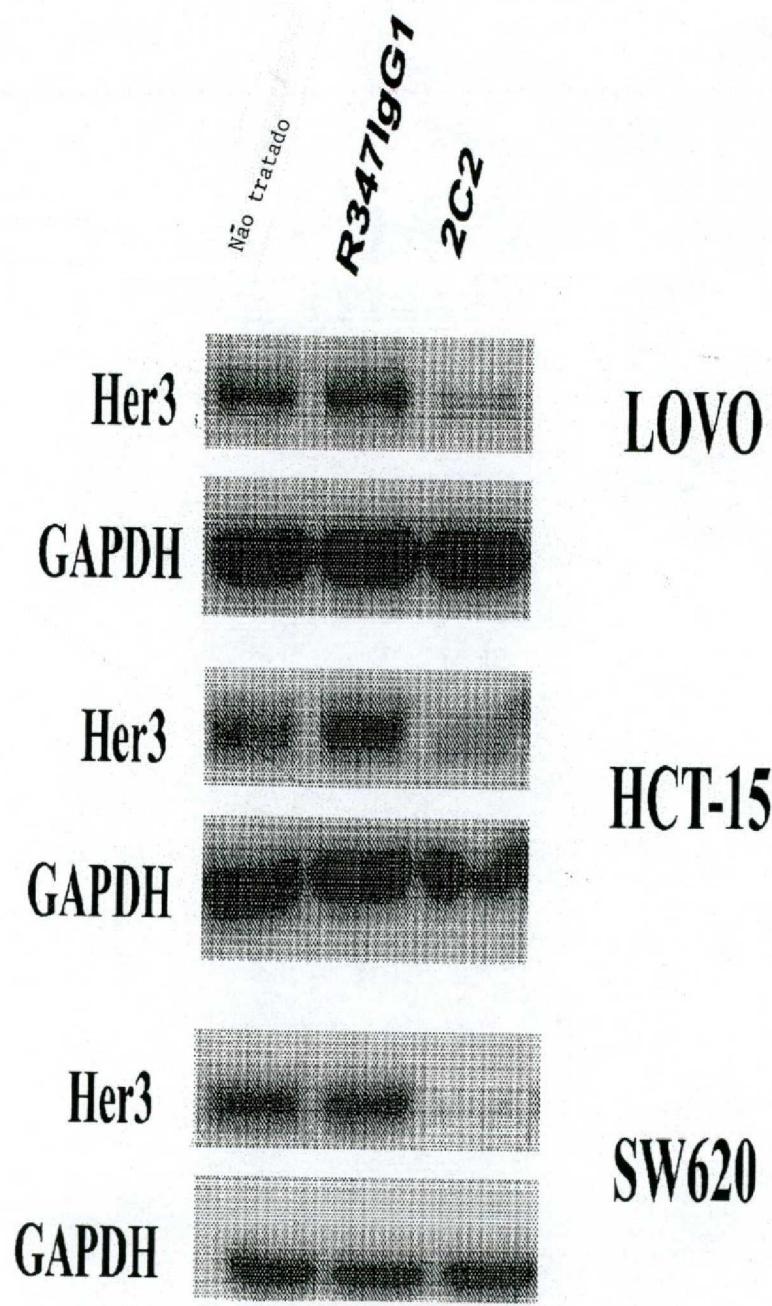


Fig. 15B

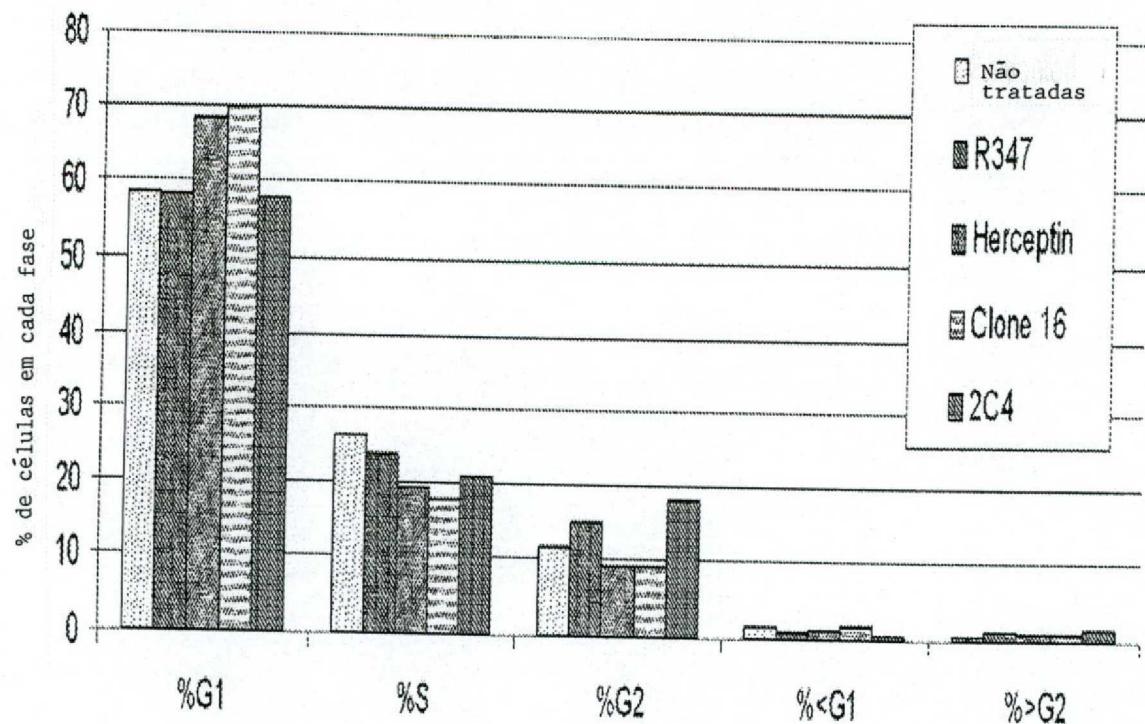


Fig. 16

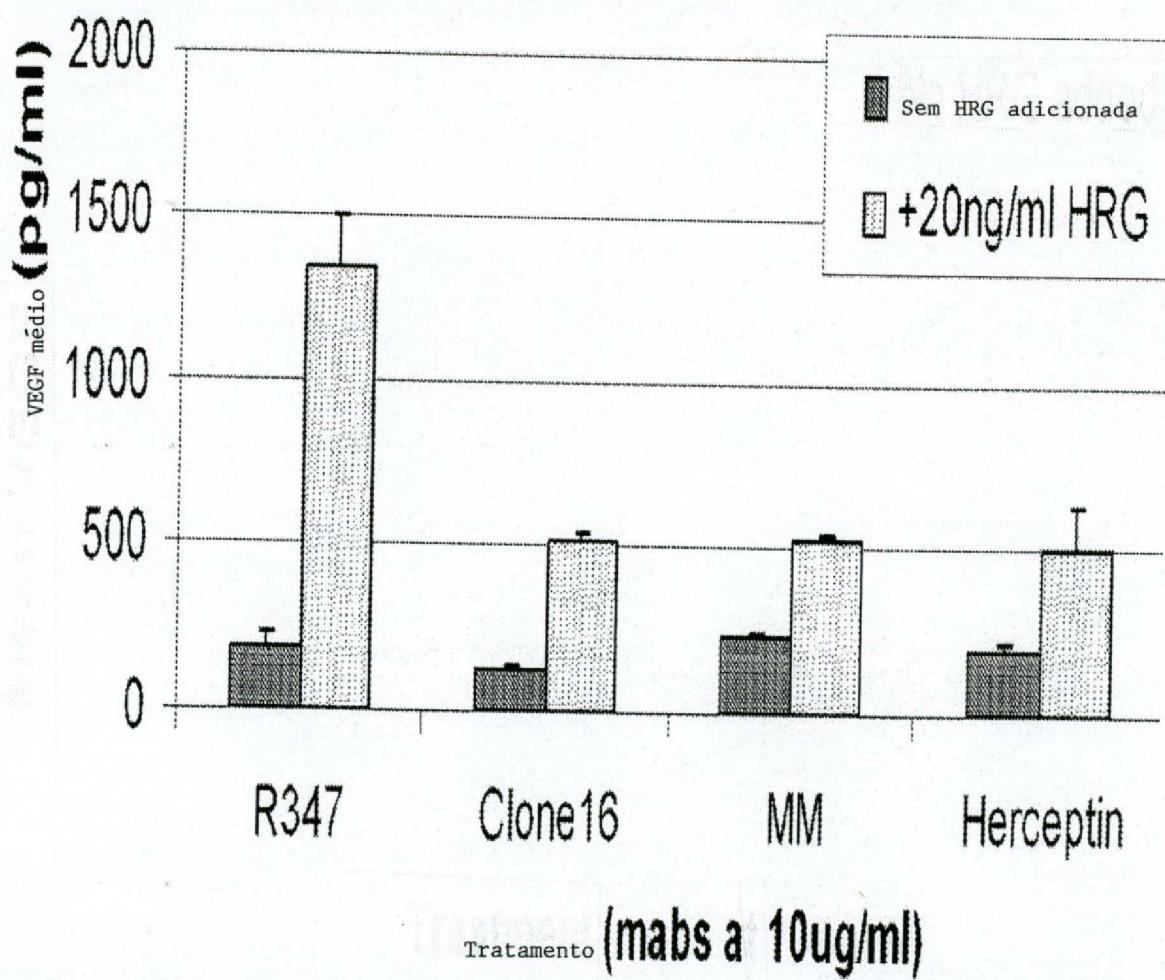


Fig. 17A

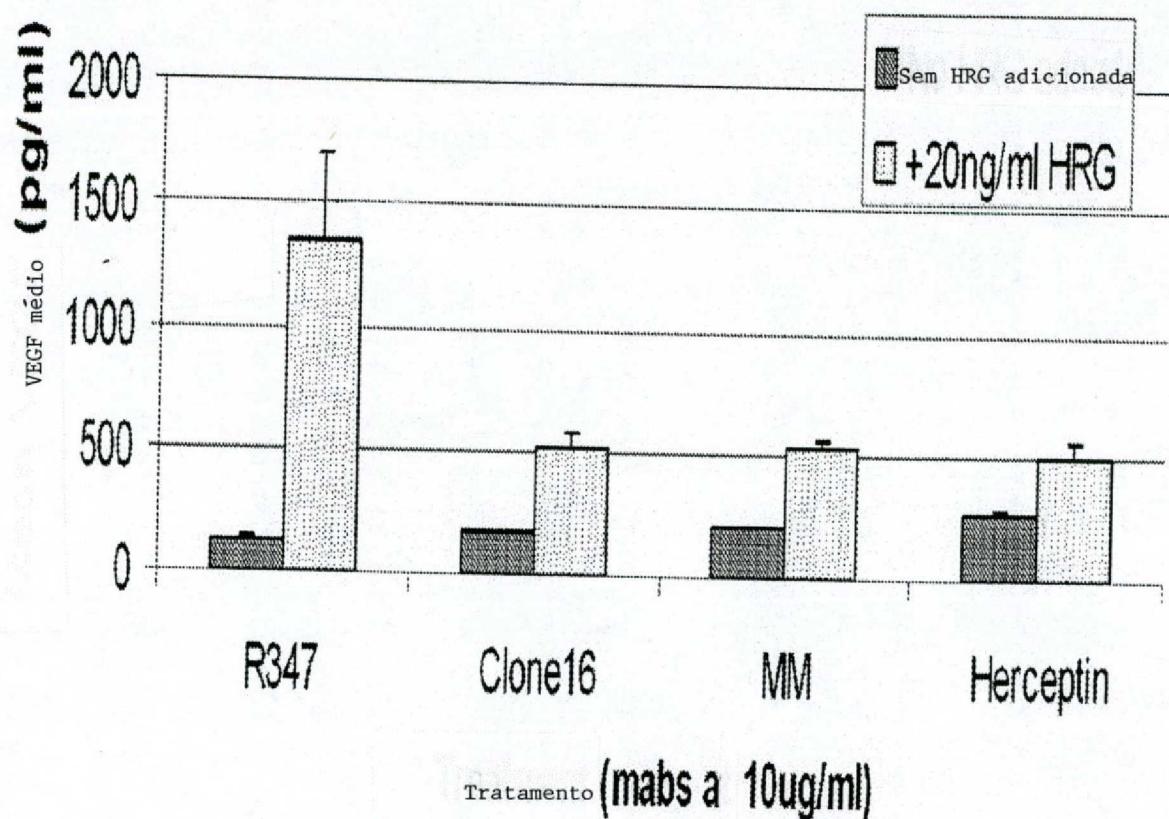


Fig. 17B

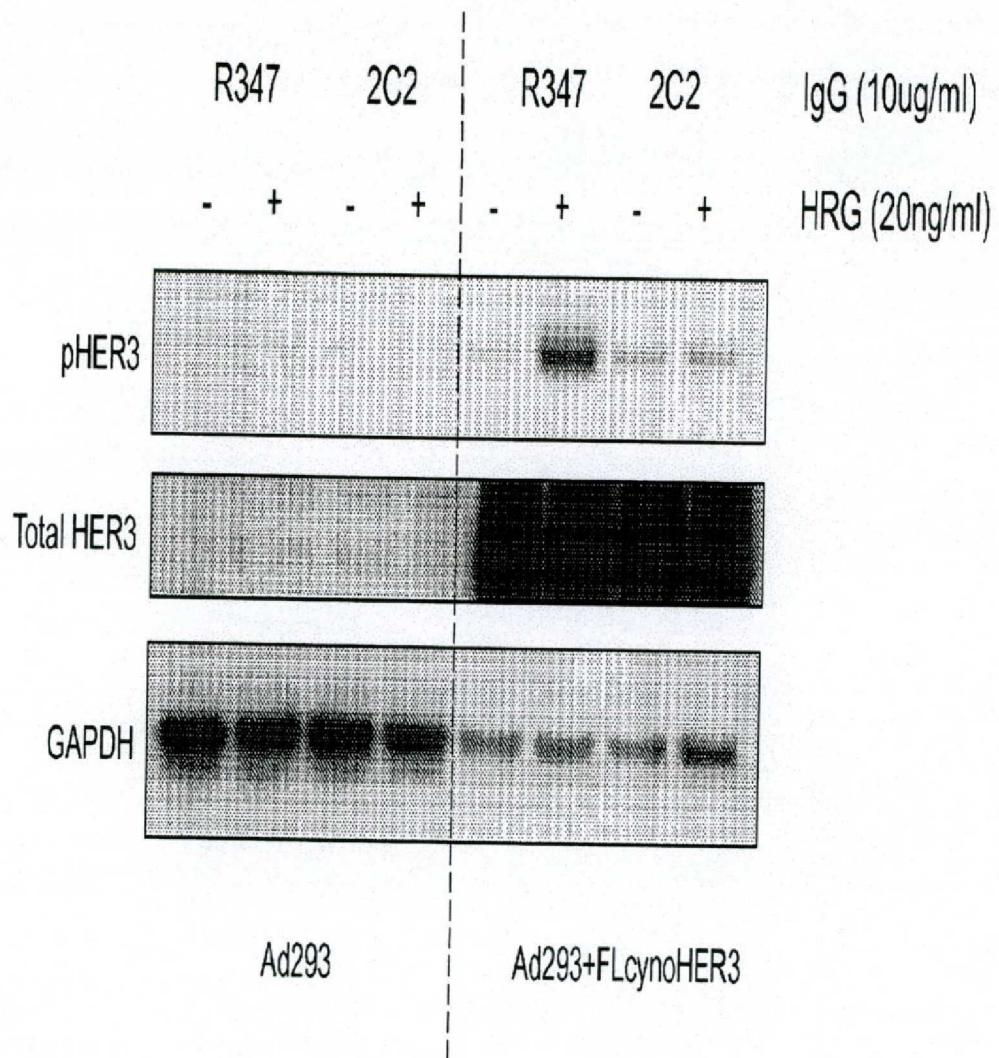


Fig. 18A

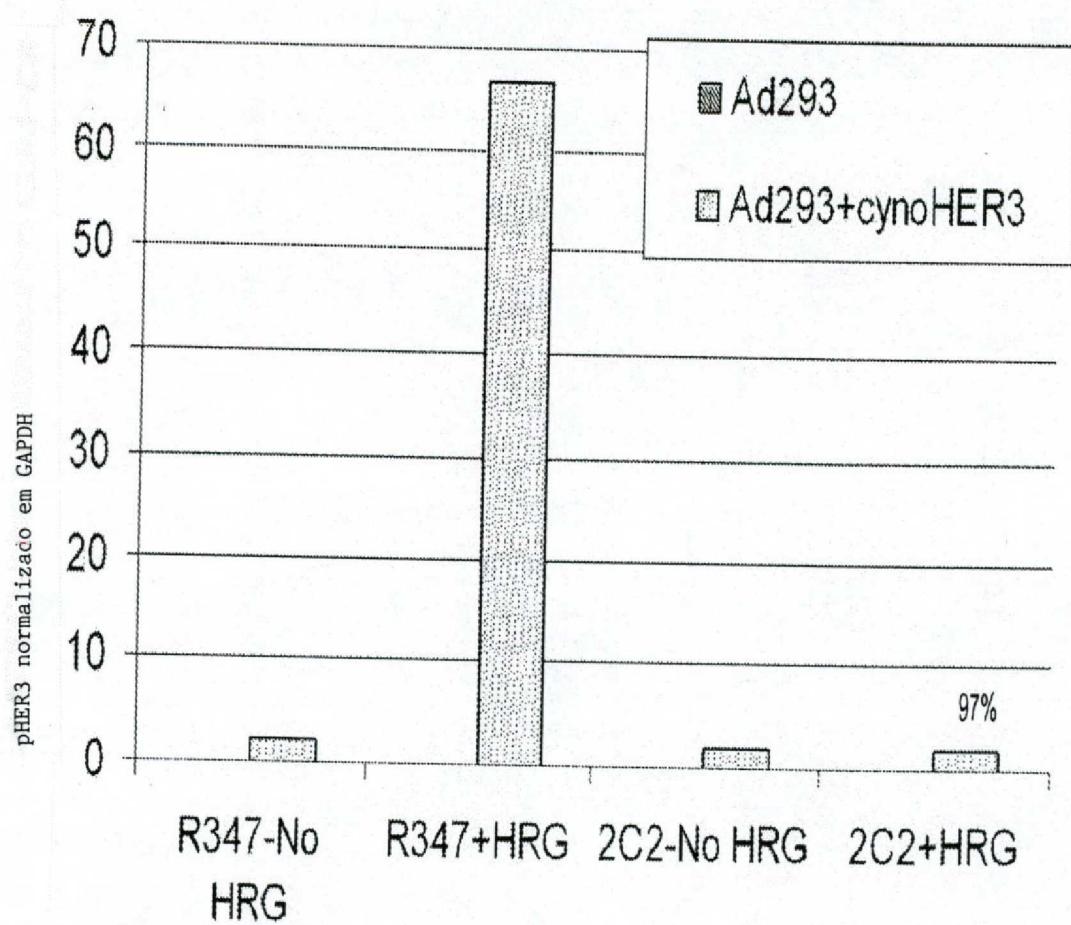


Fig. 18B

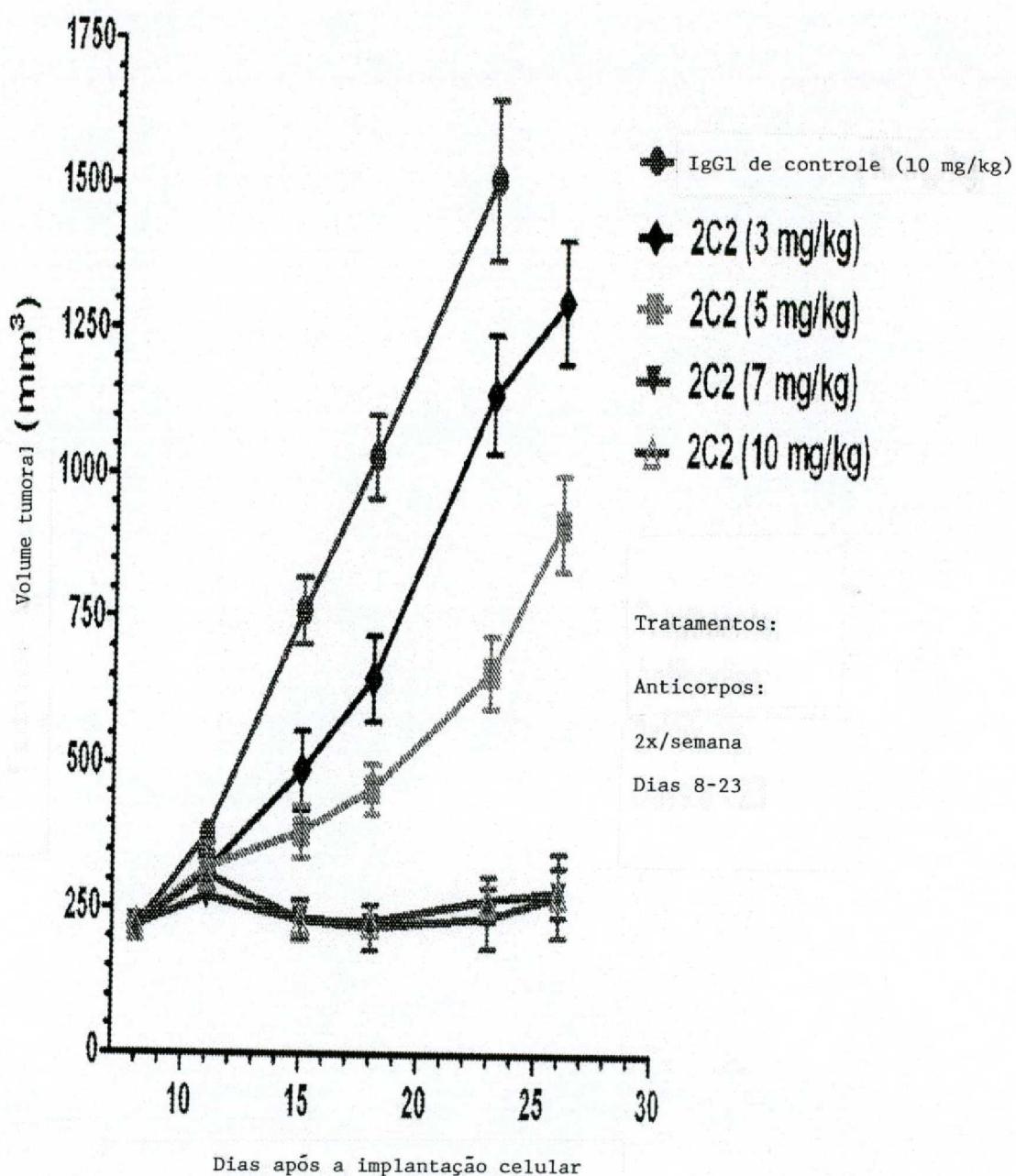


Fig. 19A

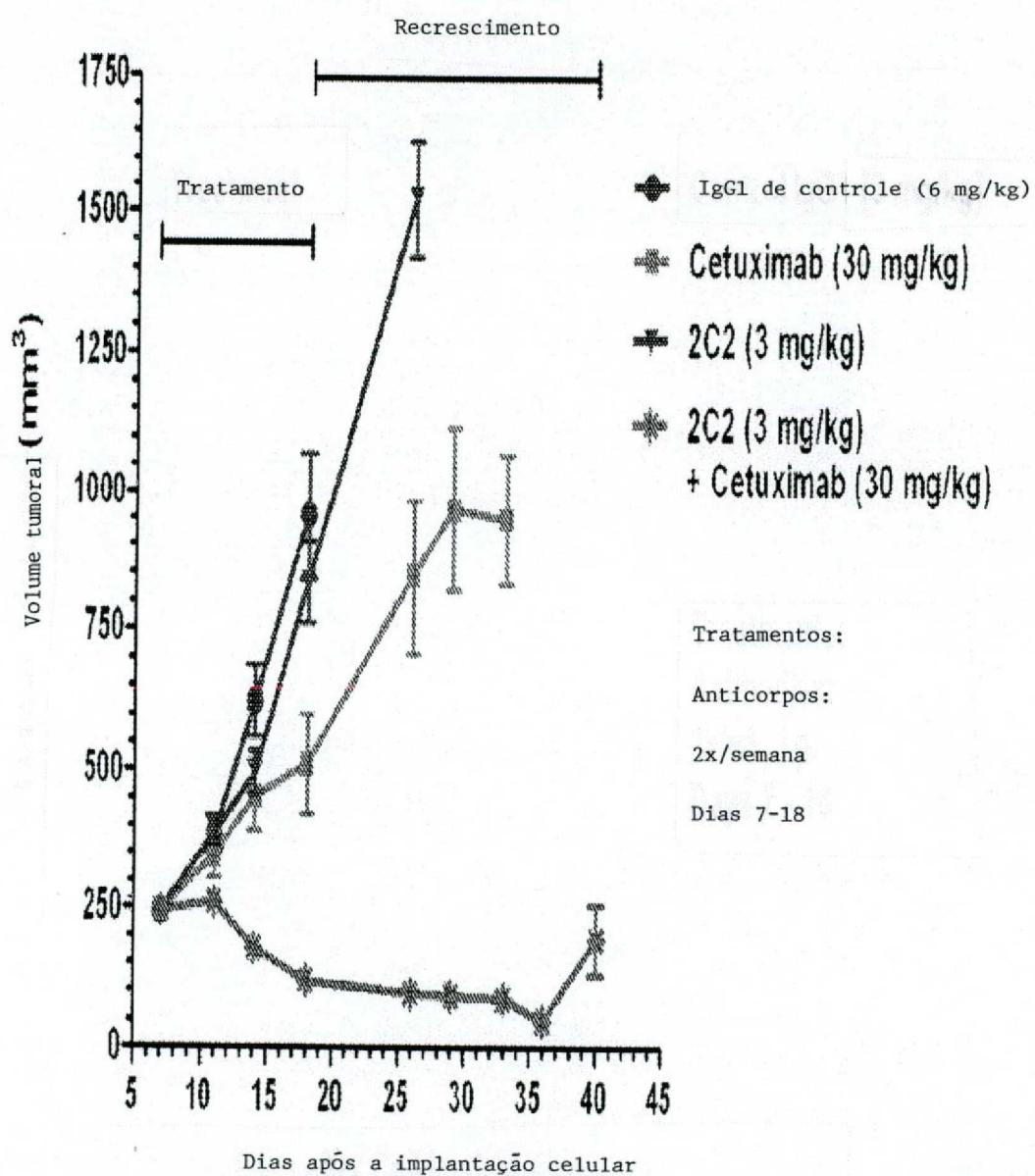


Fig. 19B

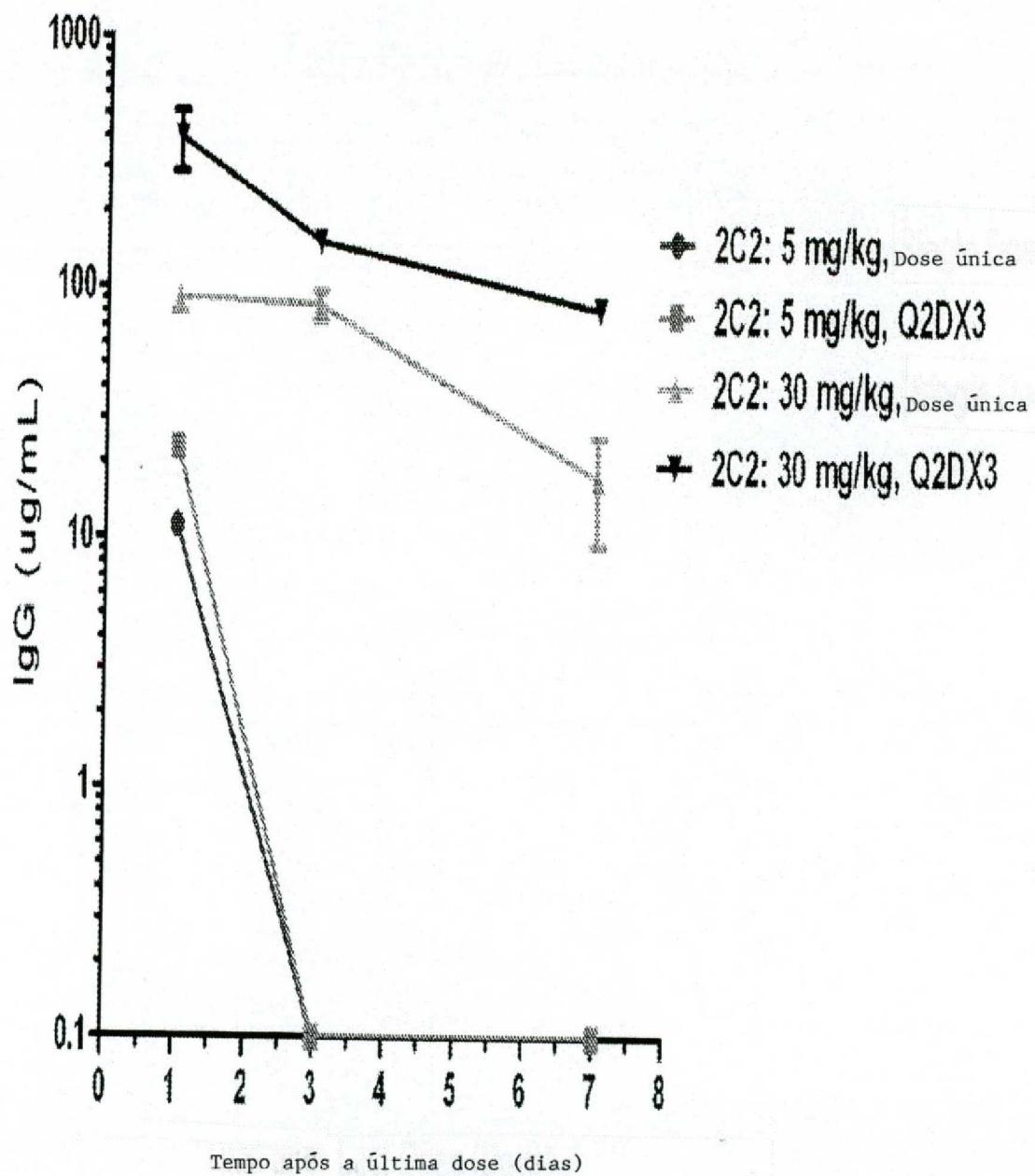


Fig. 20

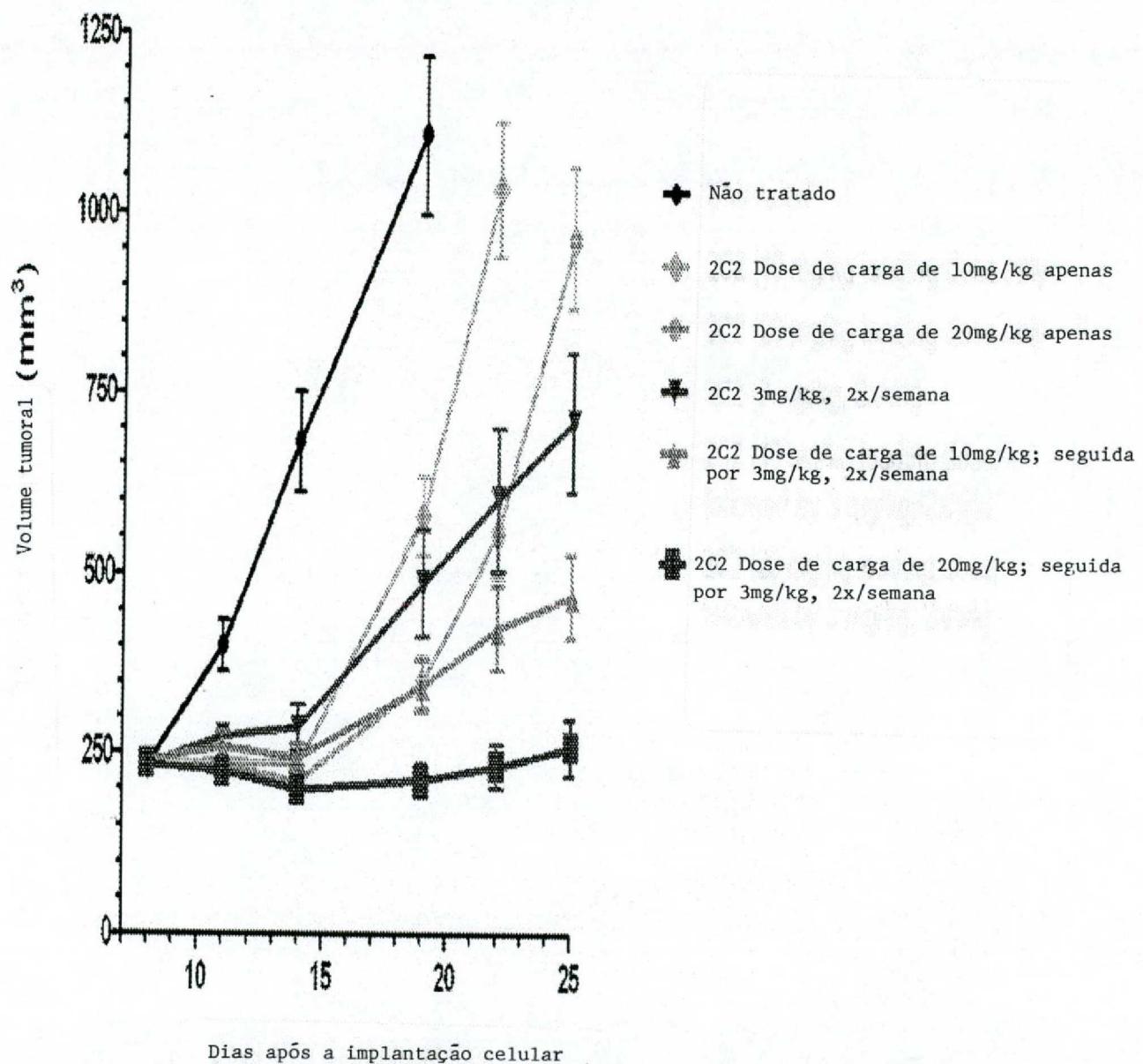
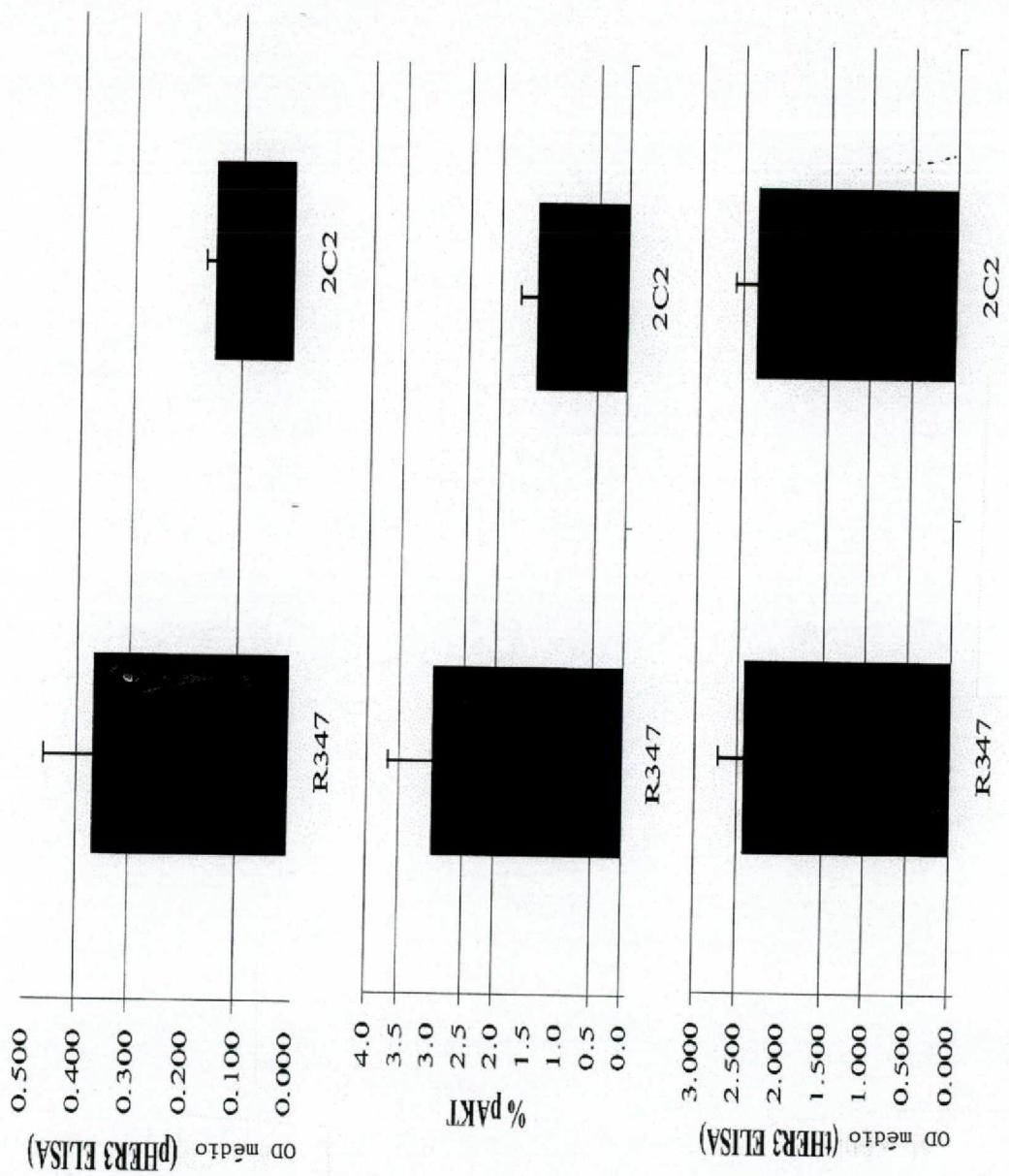


Fig. 21

**Fig. 22**

Tratamento

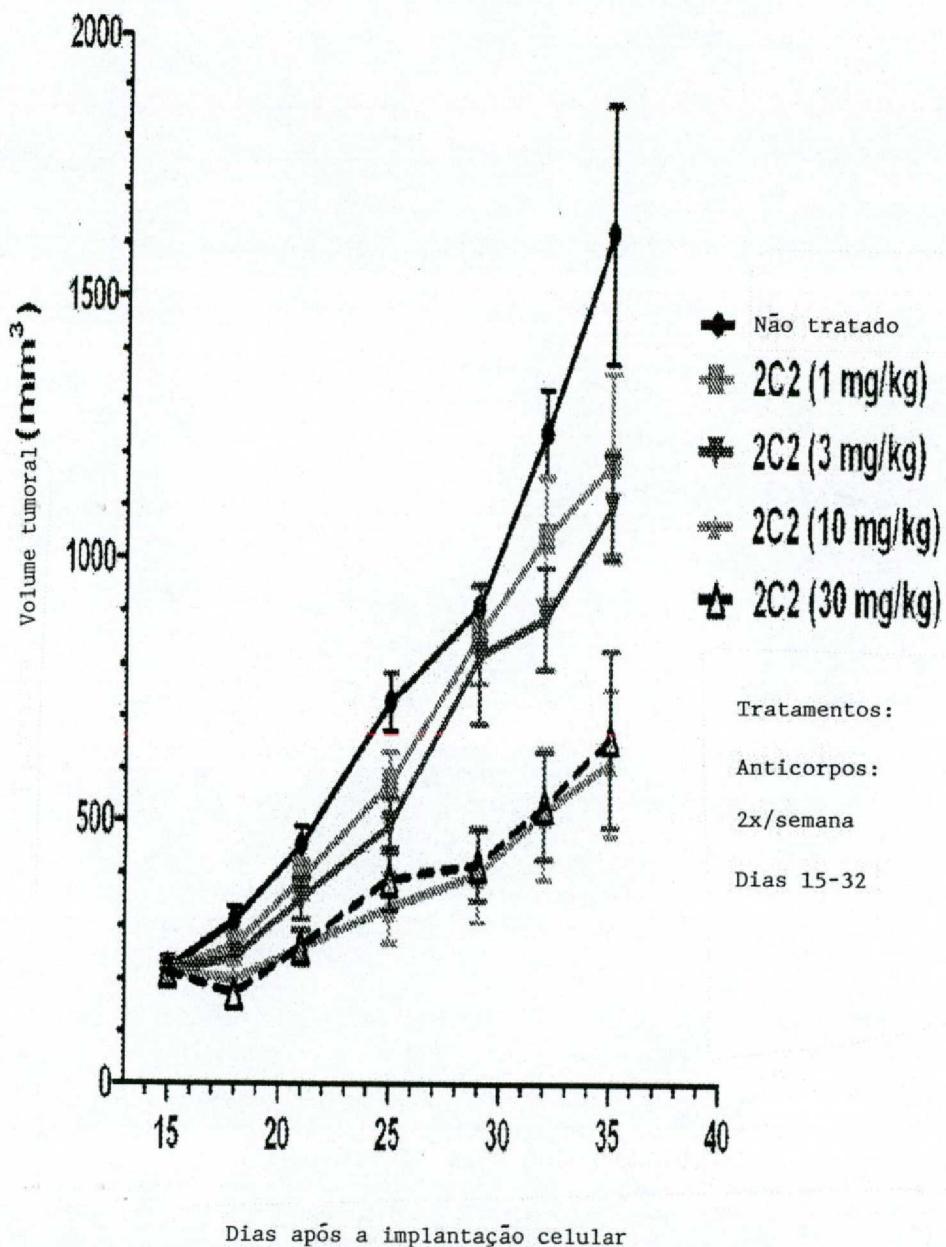
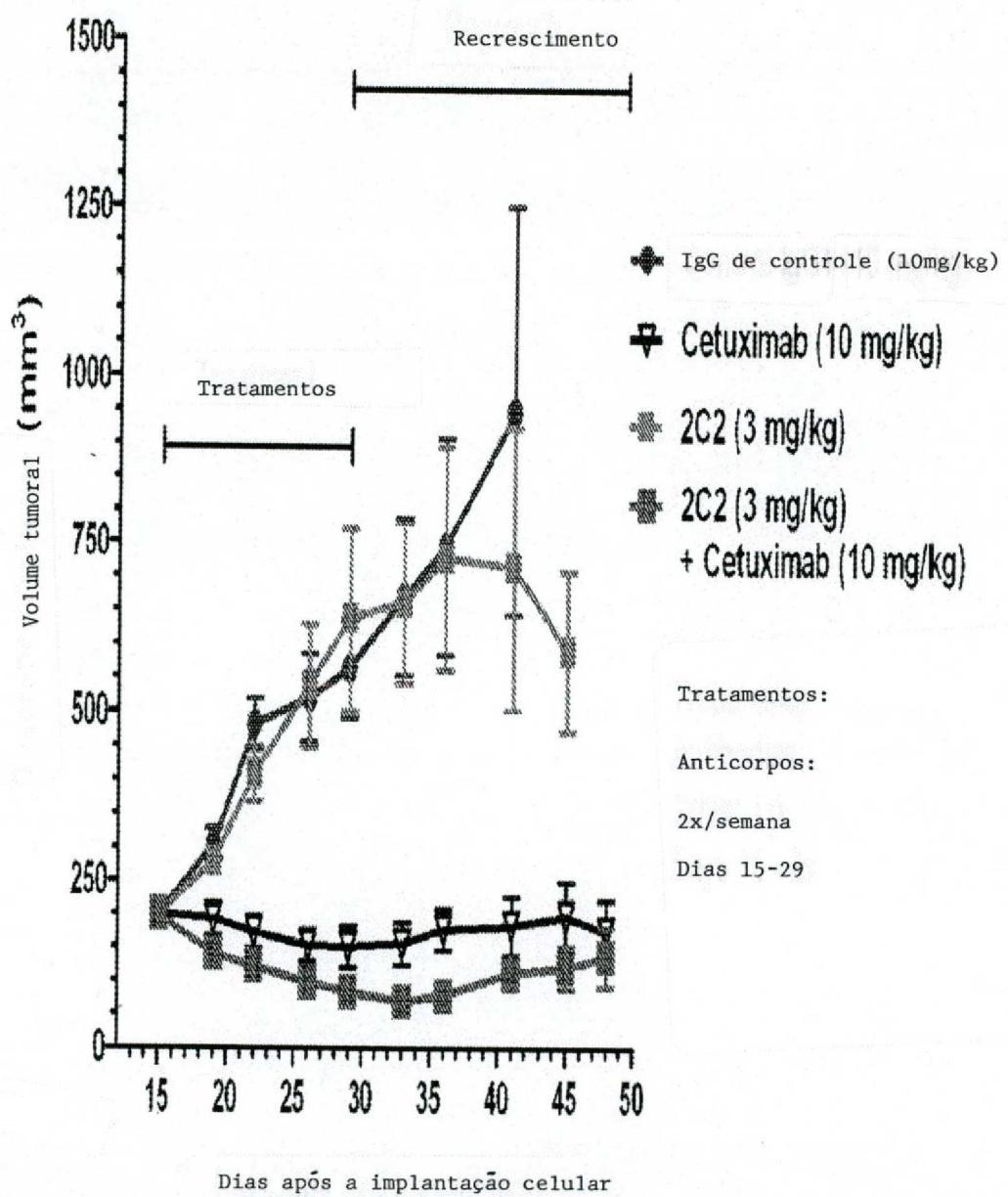


Fig. 23A

**Fig. 23B**

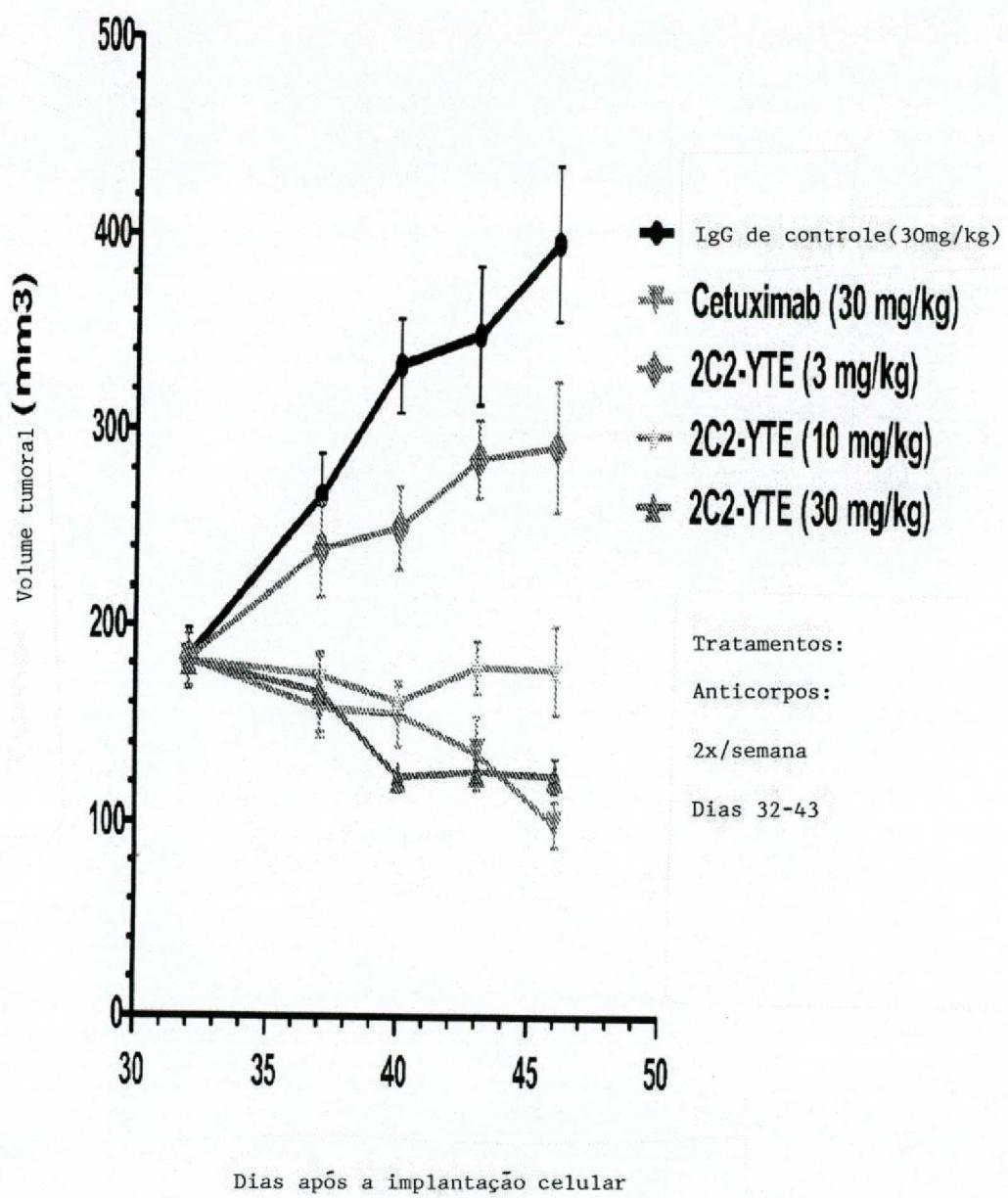


Fig. 24

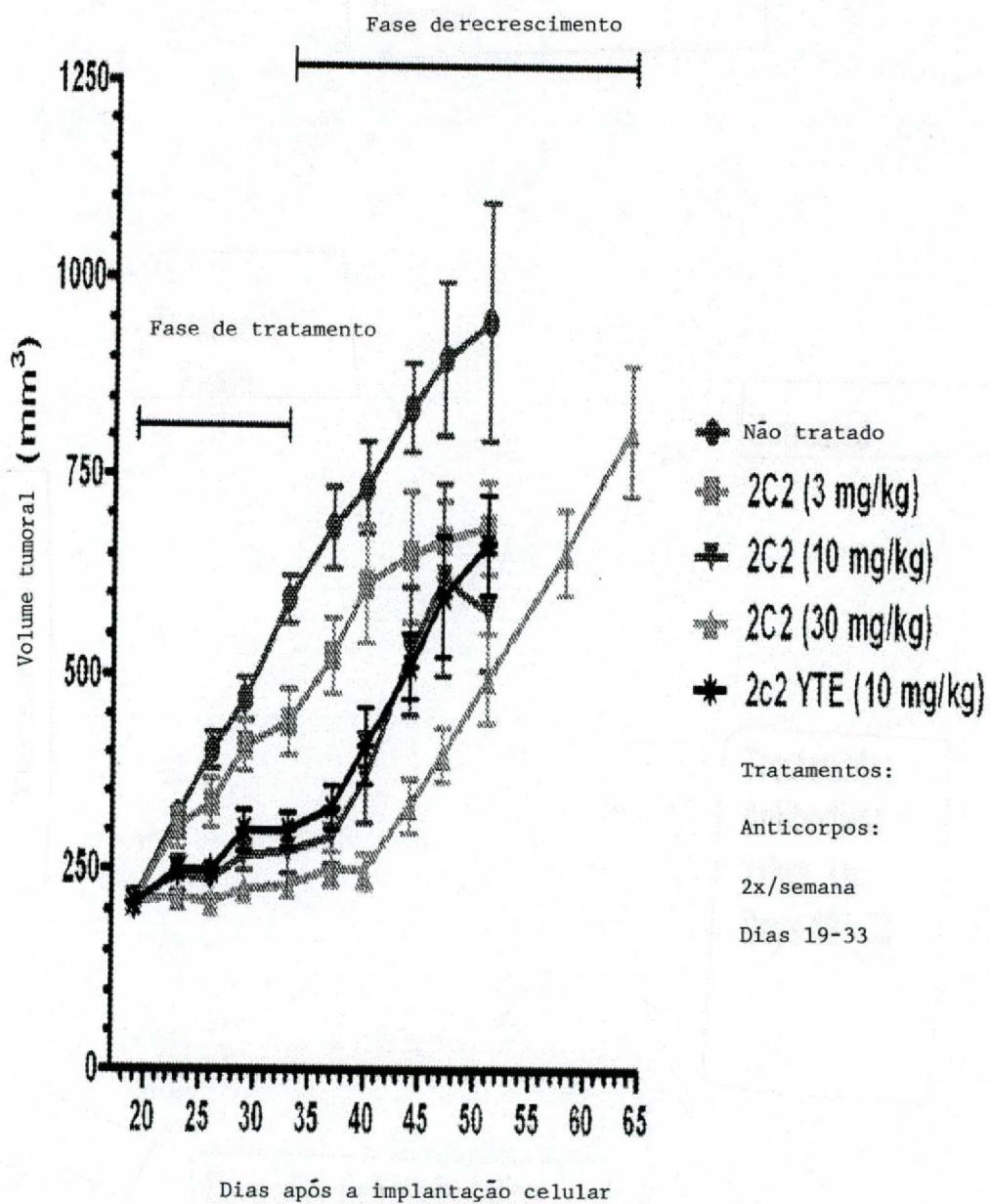


Fig. 25A

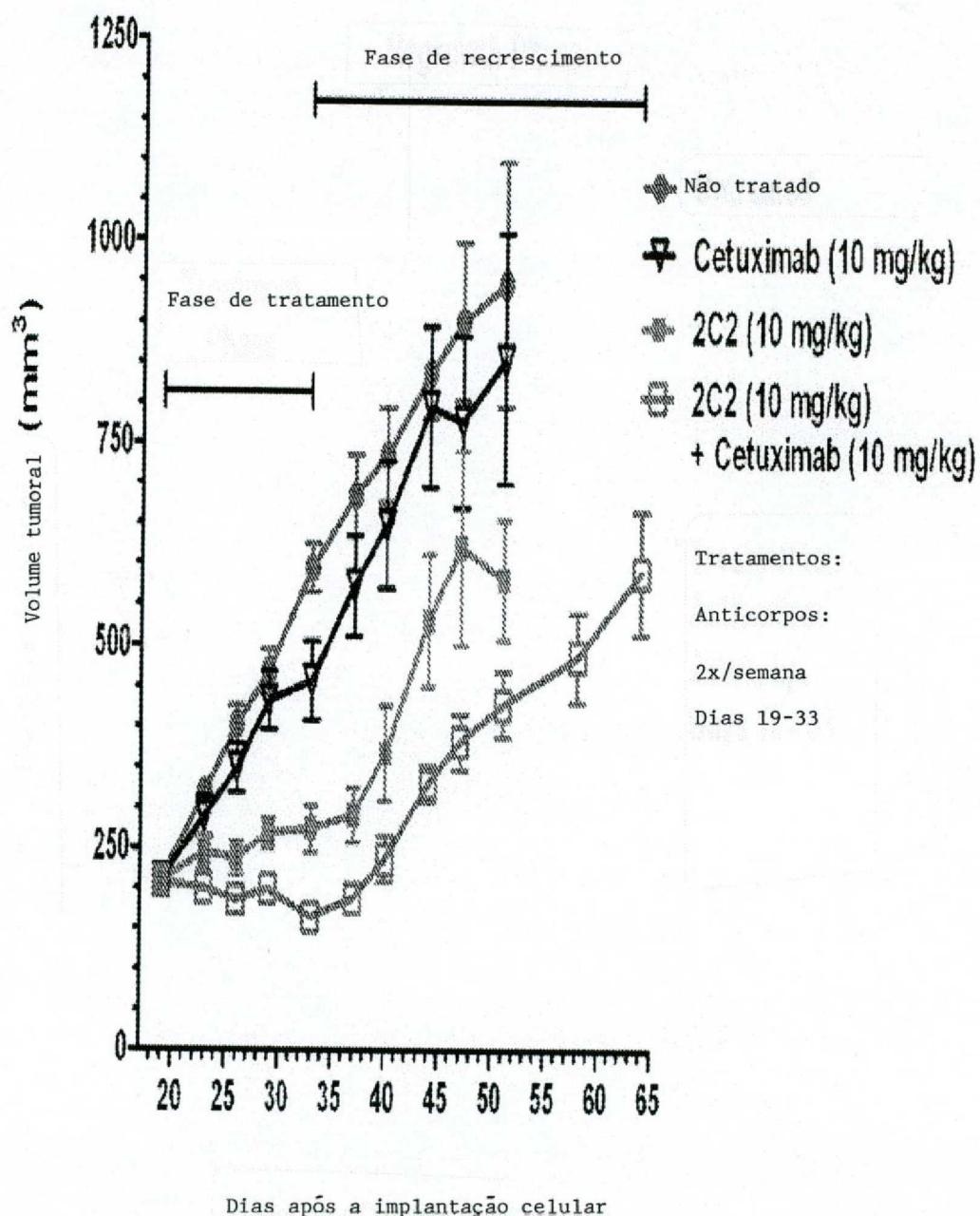


Fig. 25B

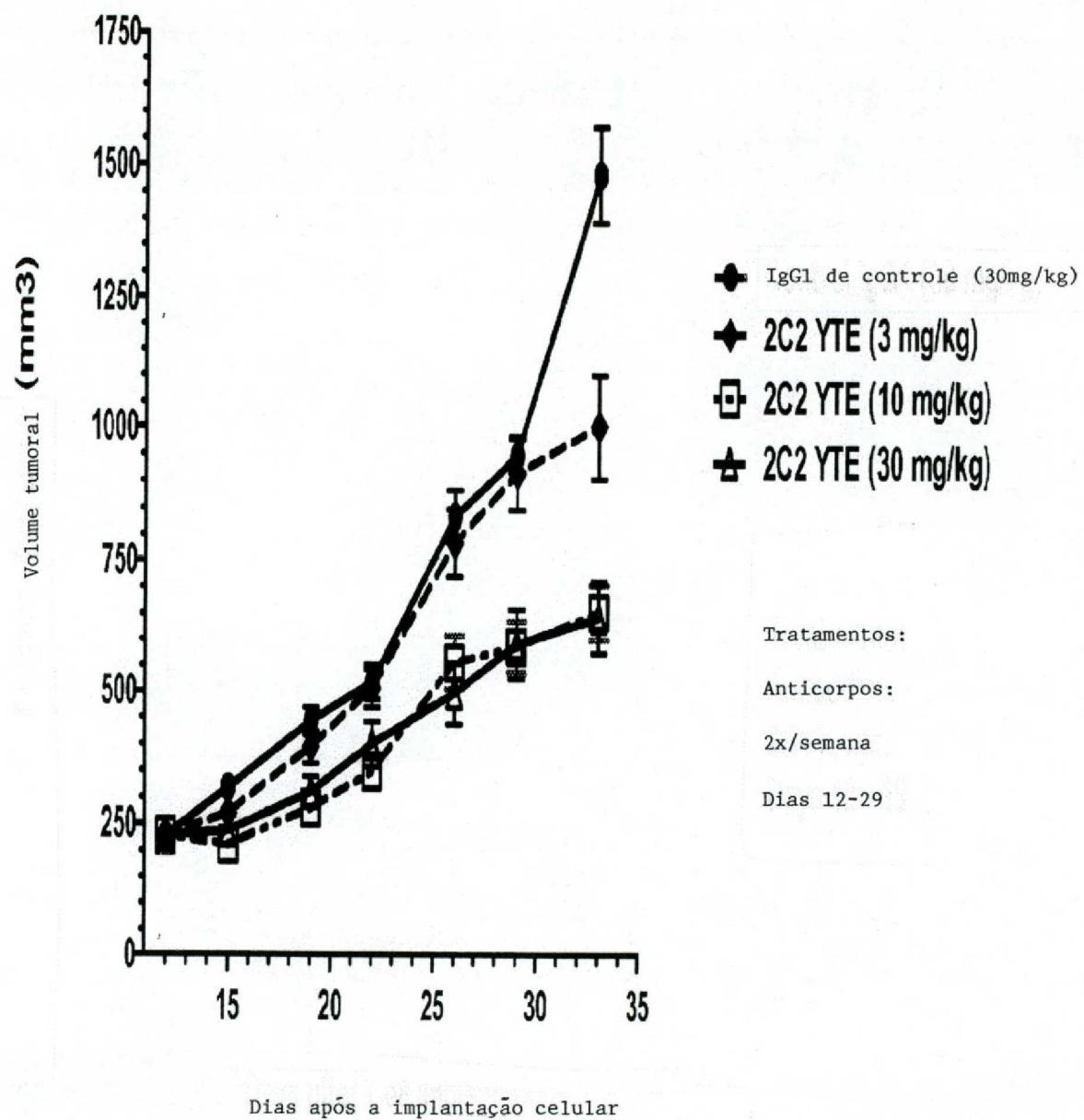


Fig. 26

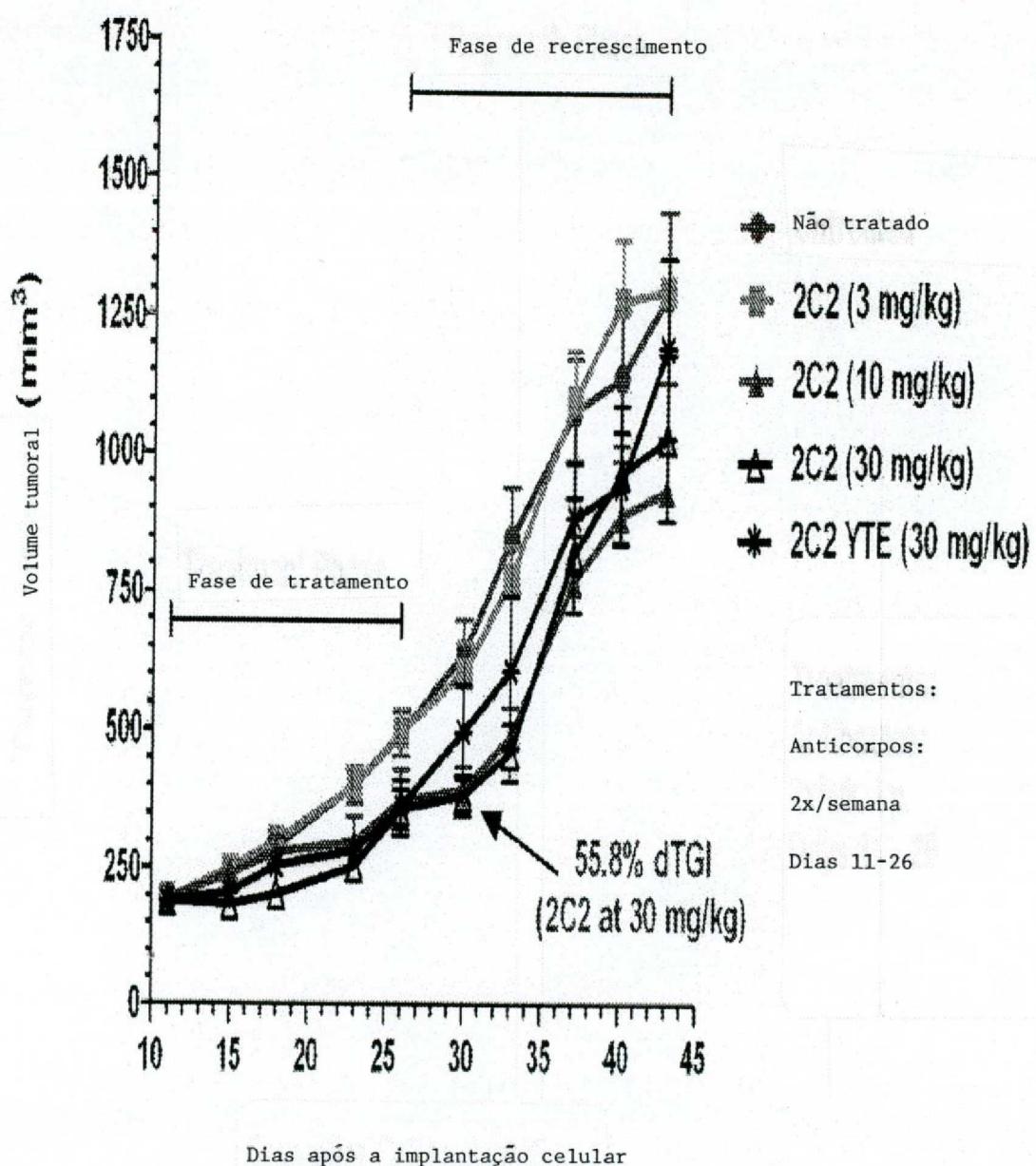


Fig. 27

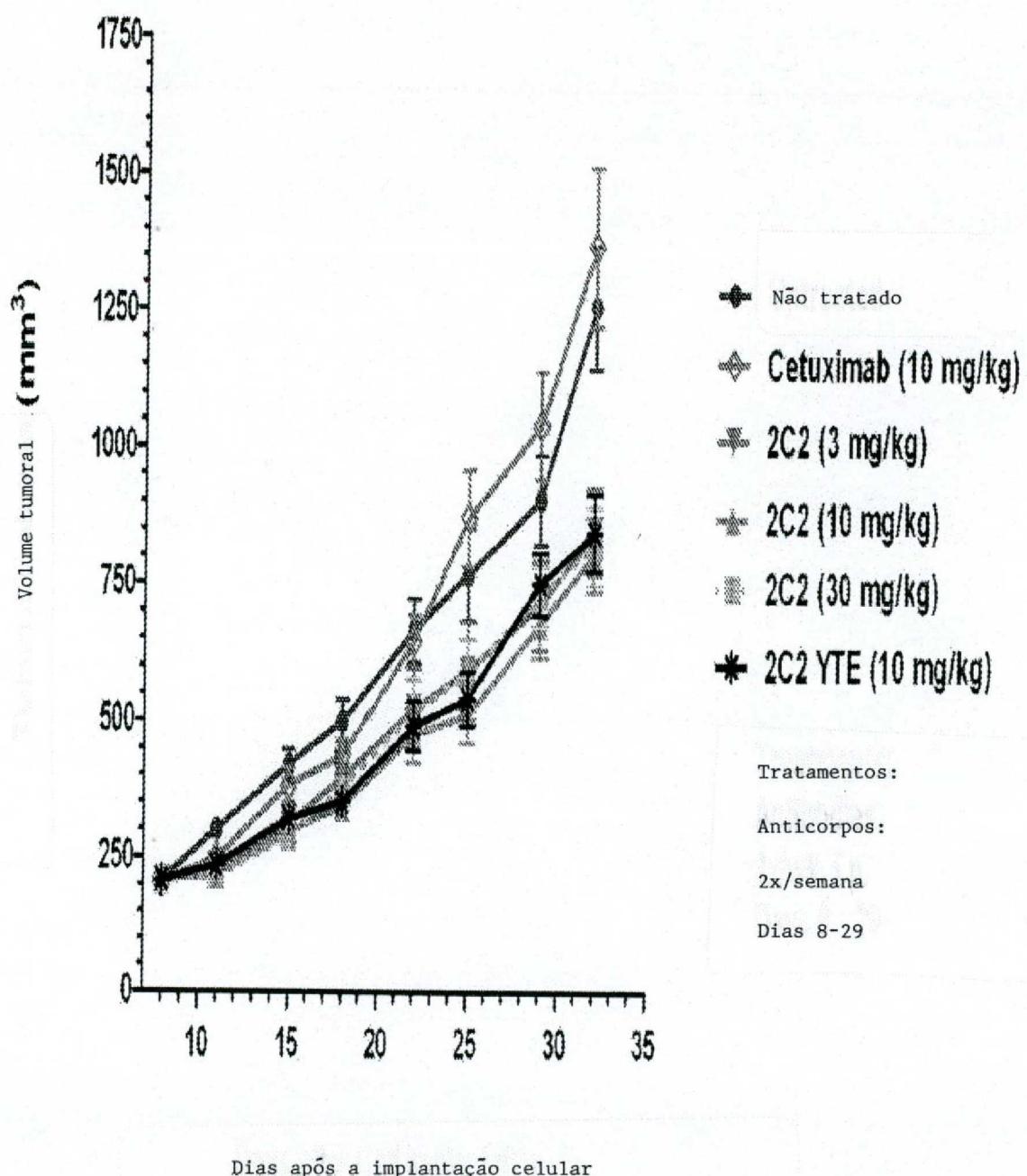


Fig. 28

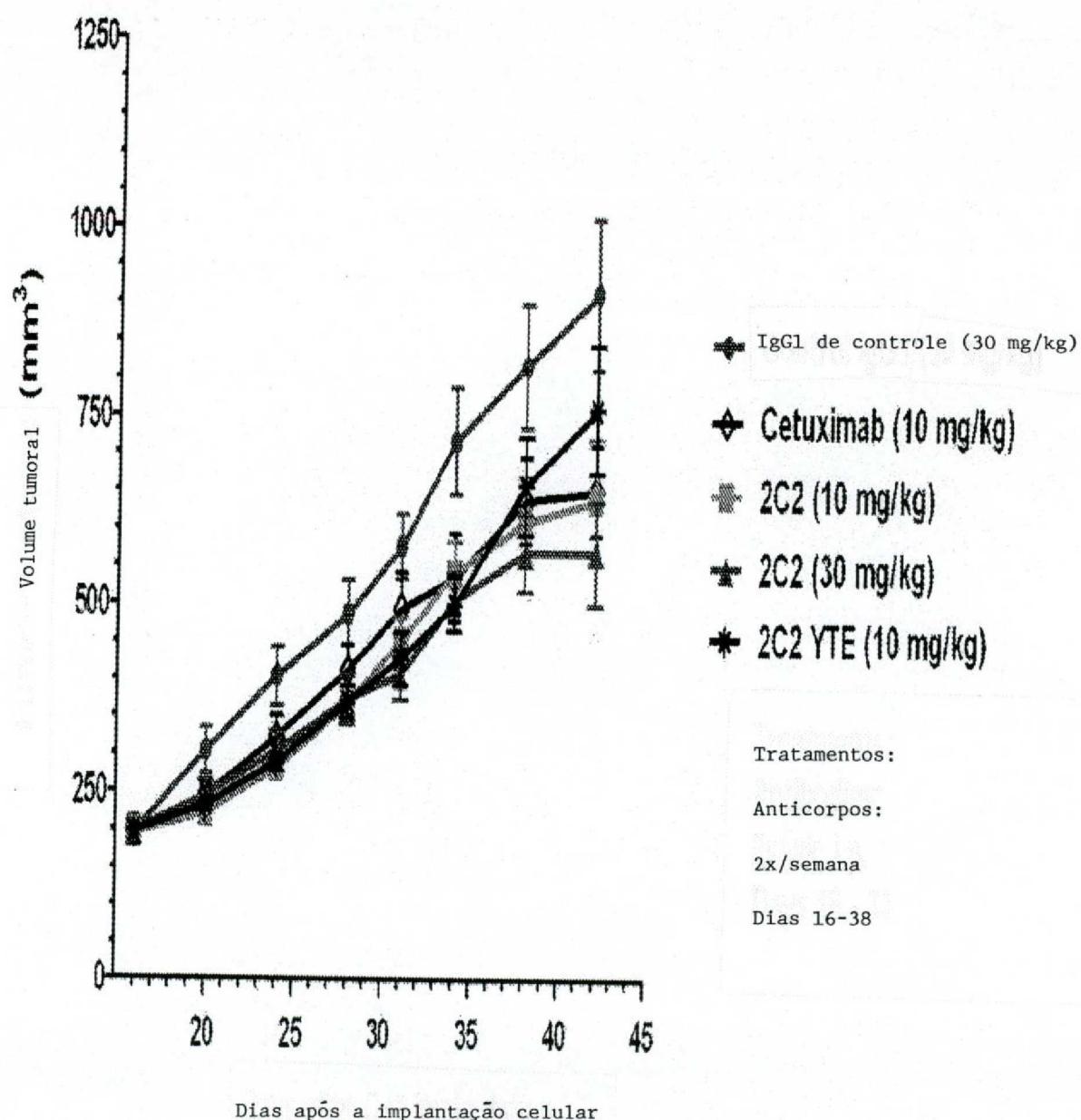


Fig. 29

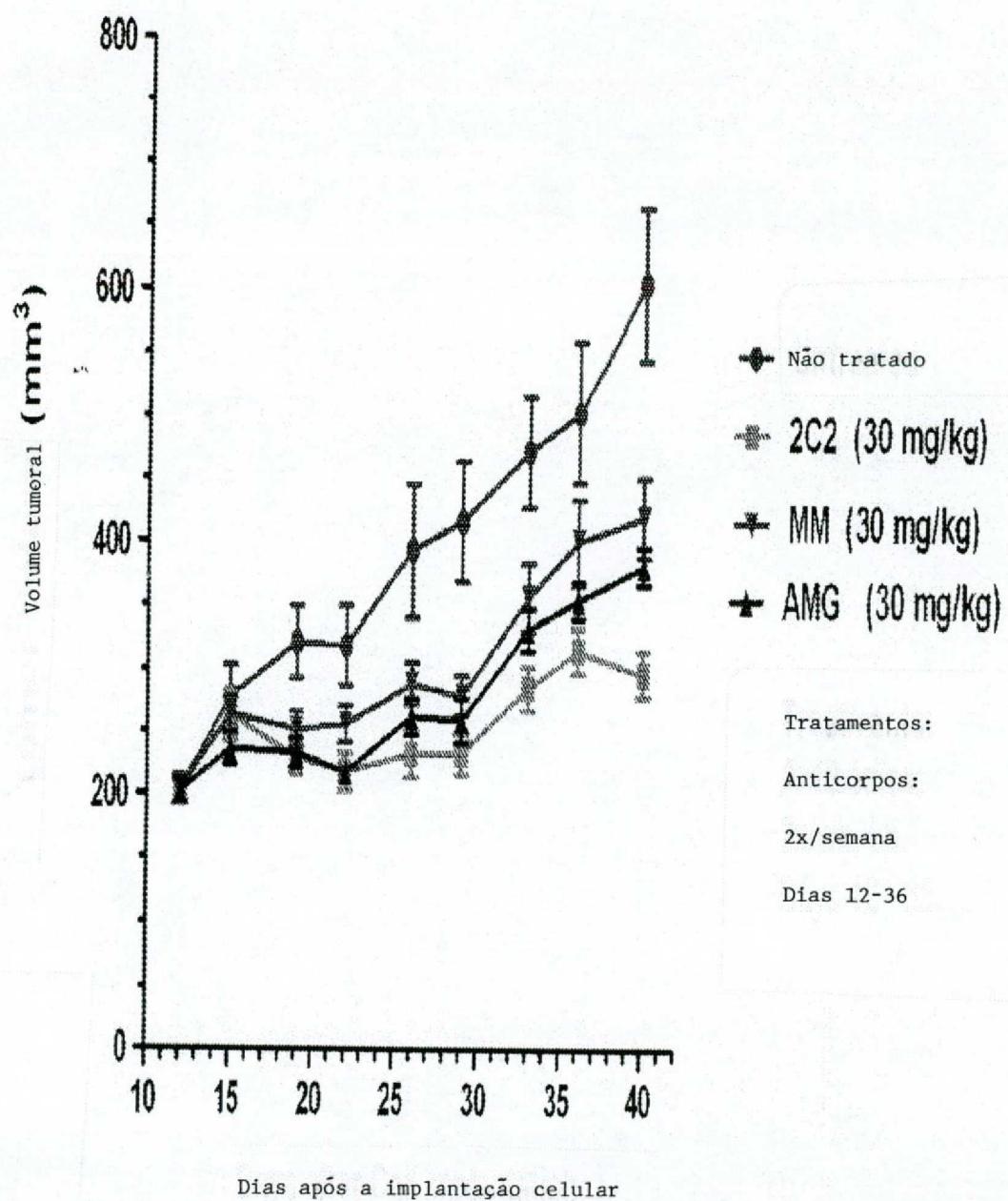


Fig. 30

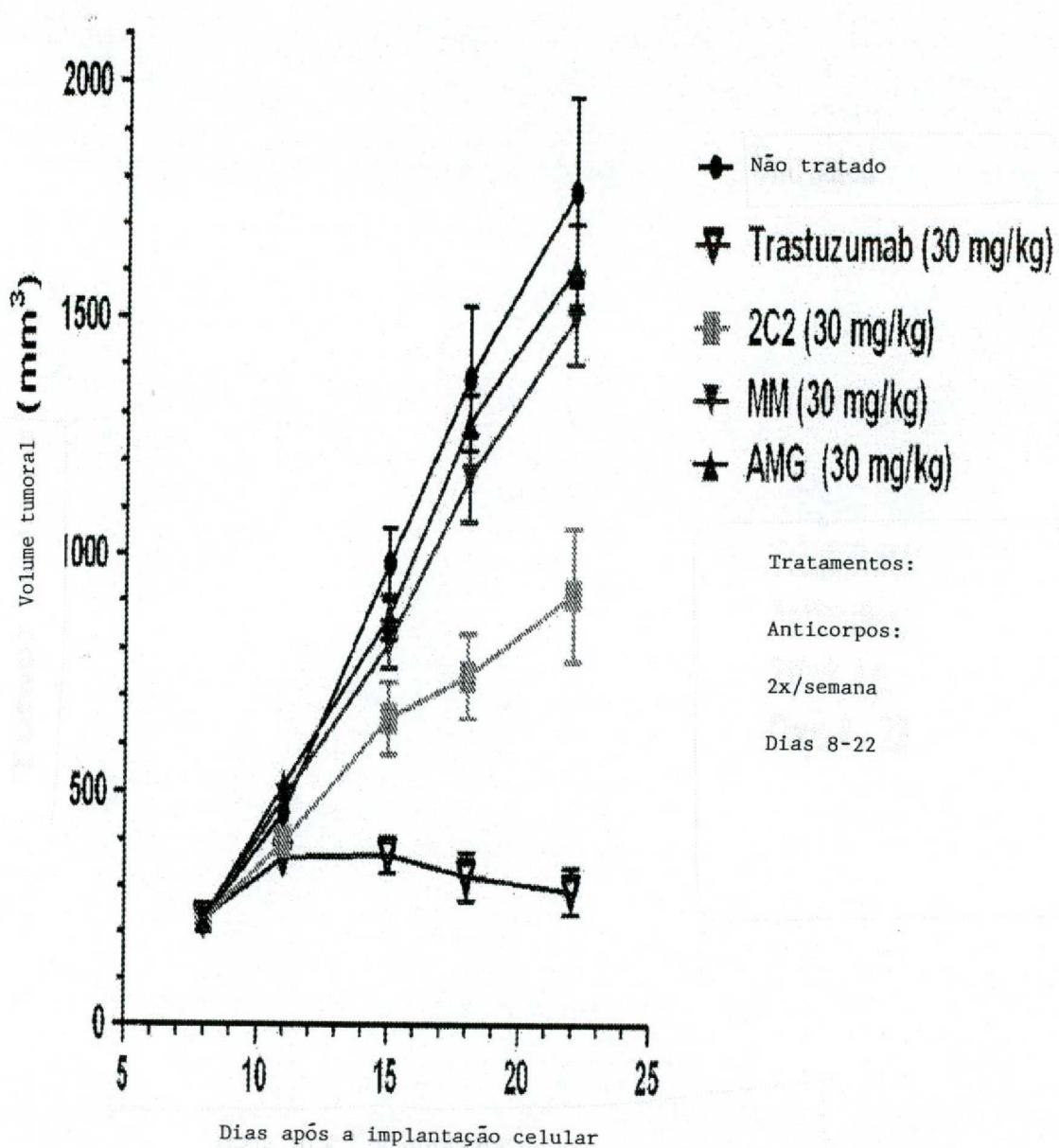


Fig. 31A

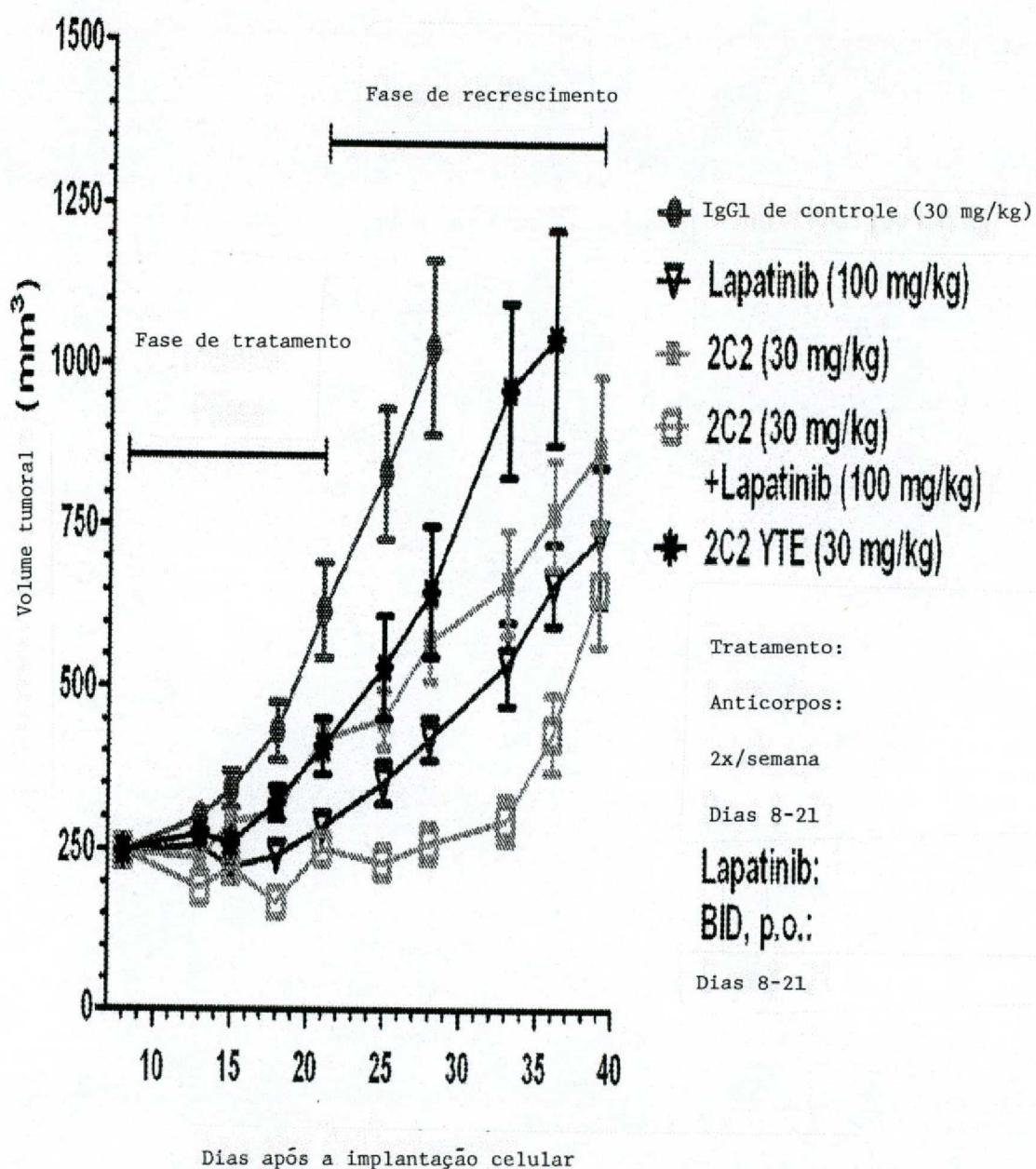


Fig. 31B

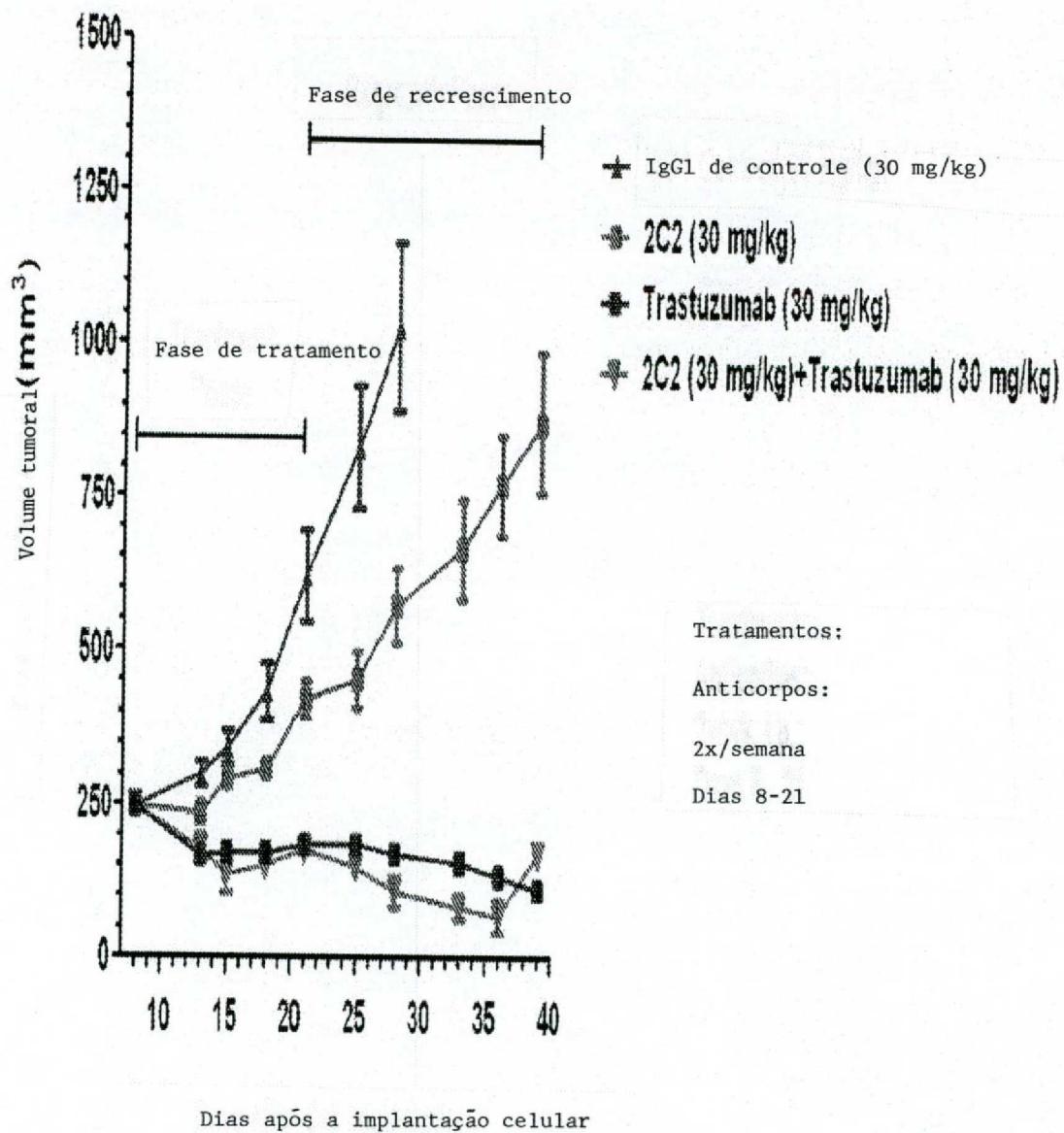


Fig. 31C

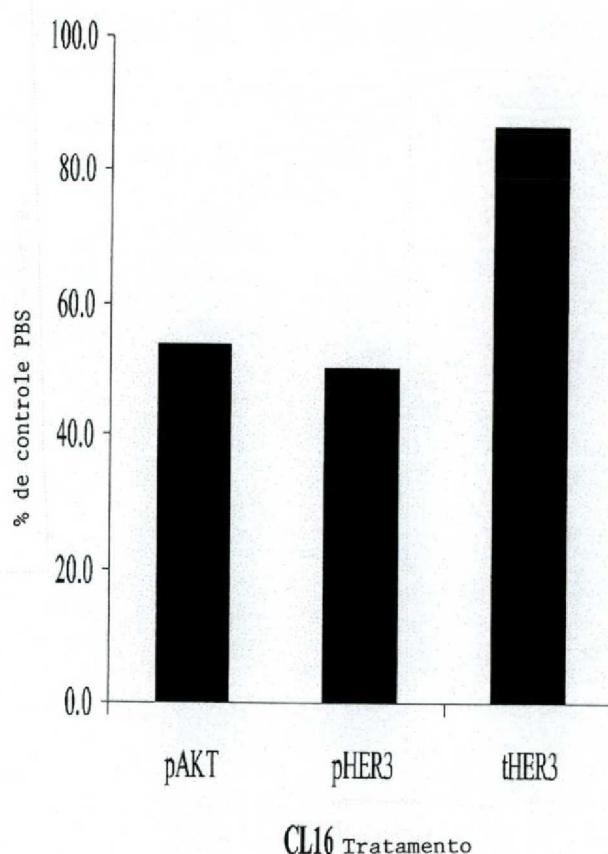


Fig. 32

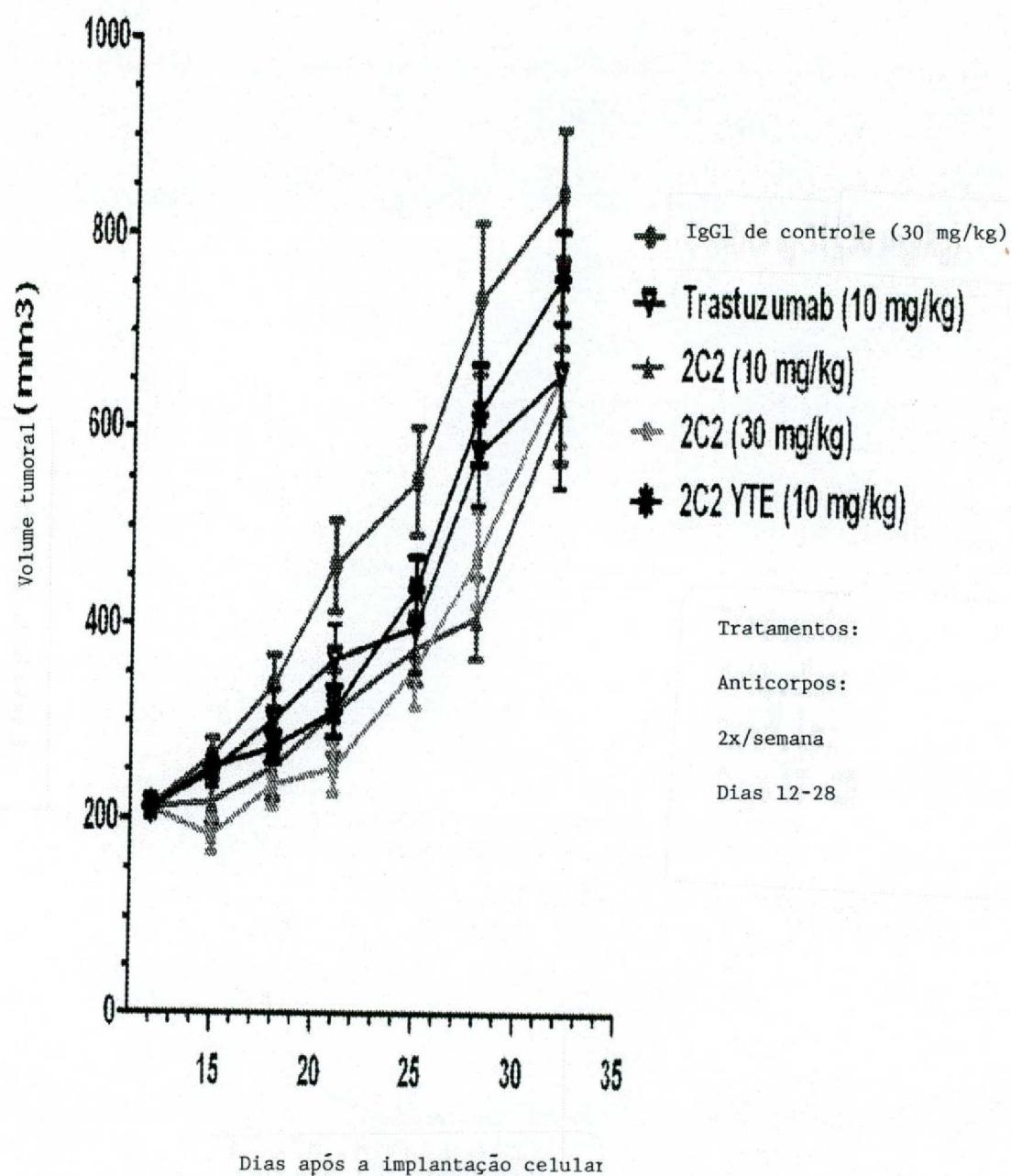


Fig. 33A

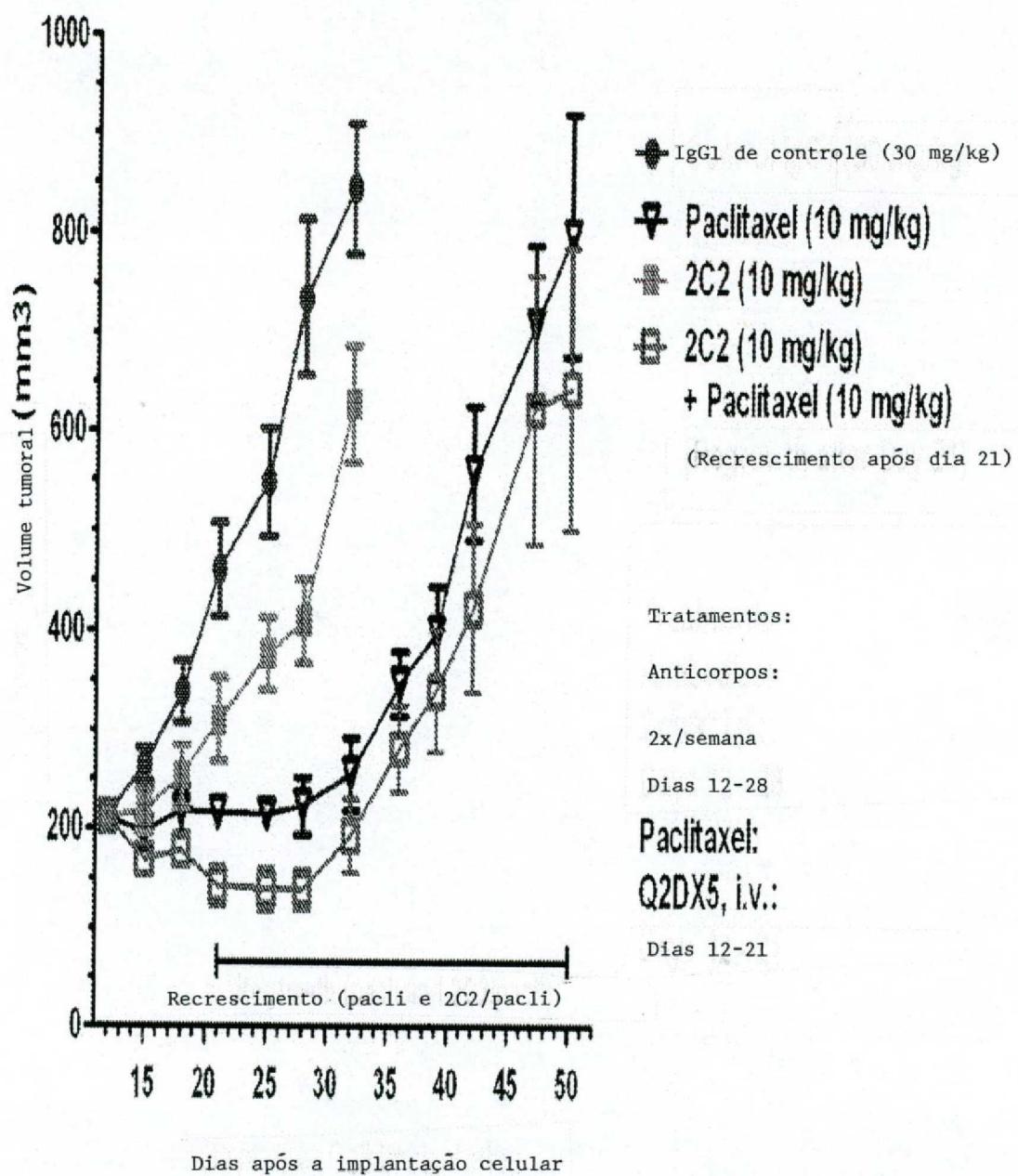


Fig. 33B

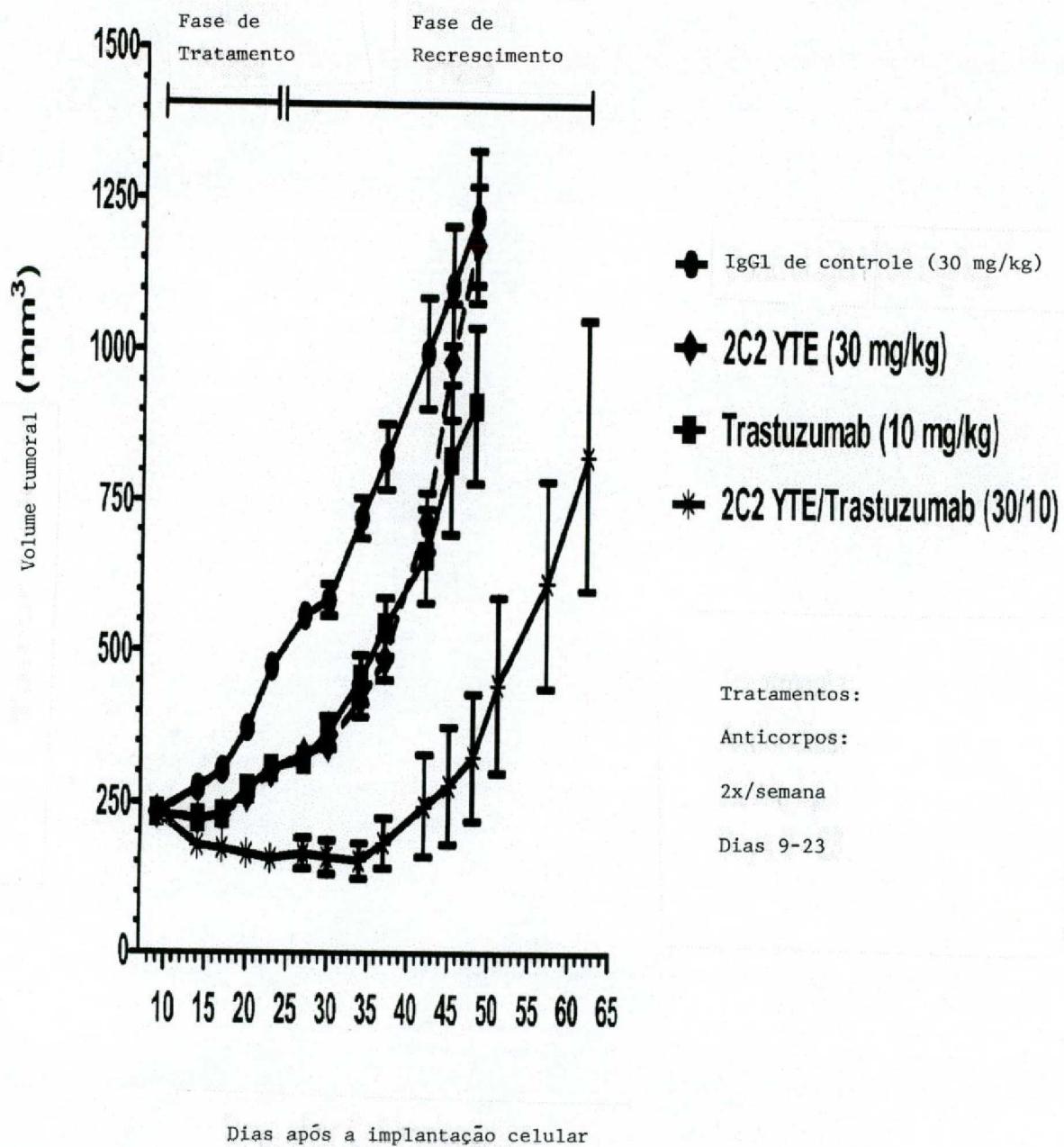


Fig. 34A

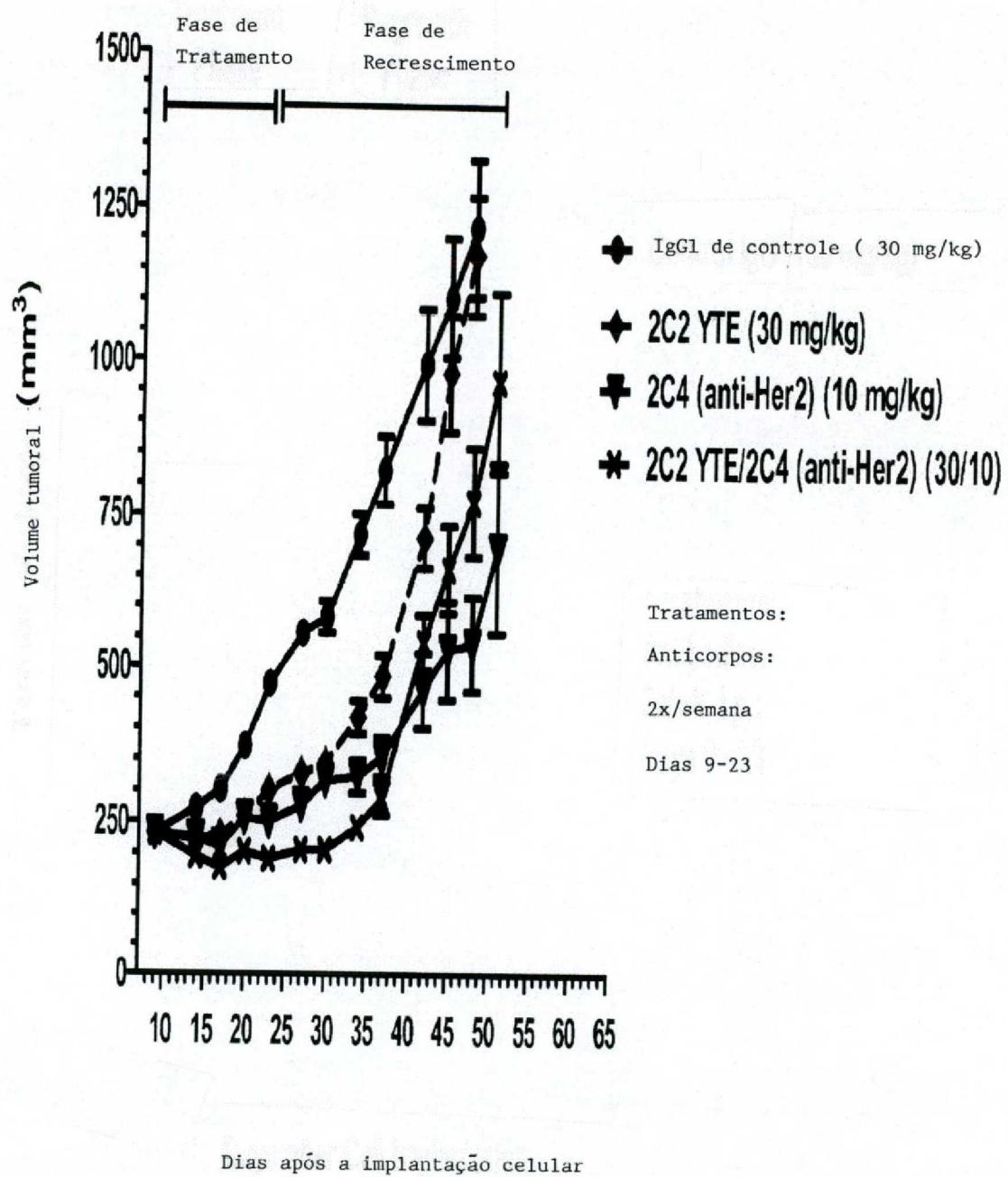


Fig. 34B

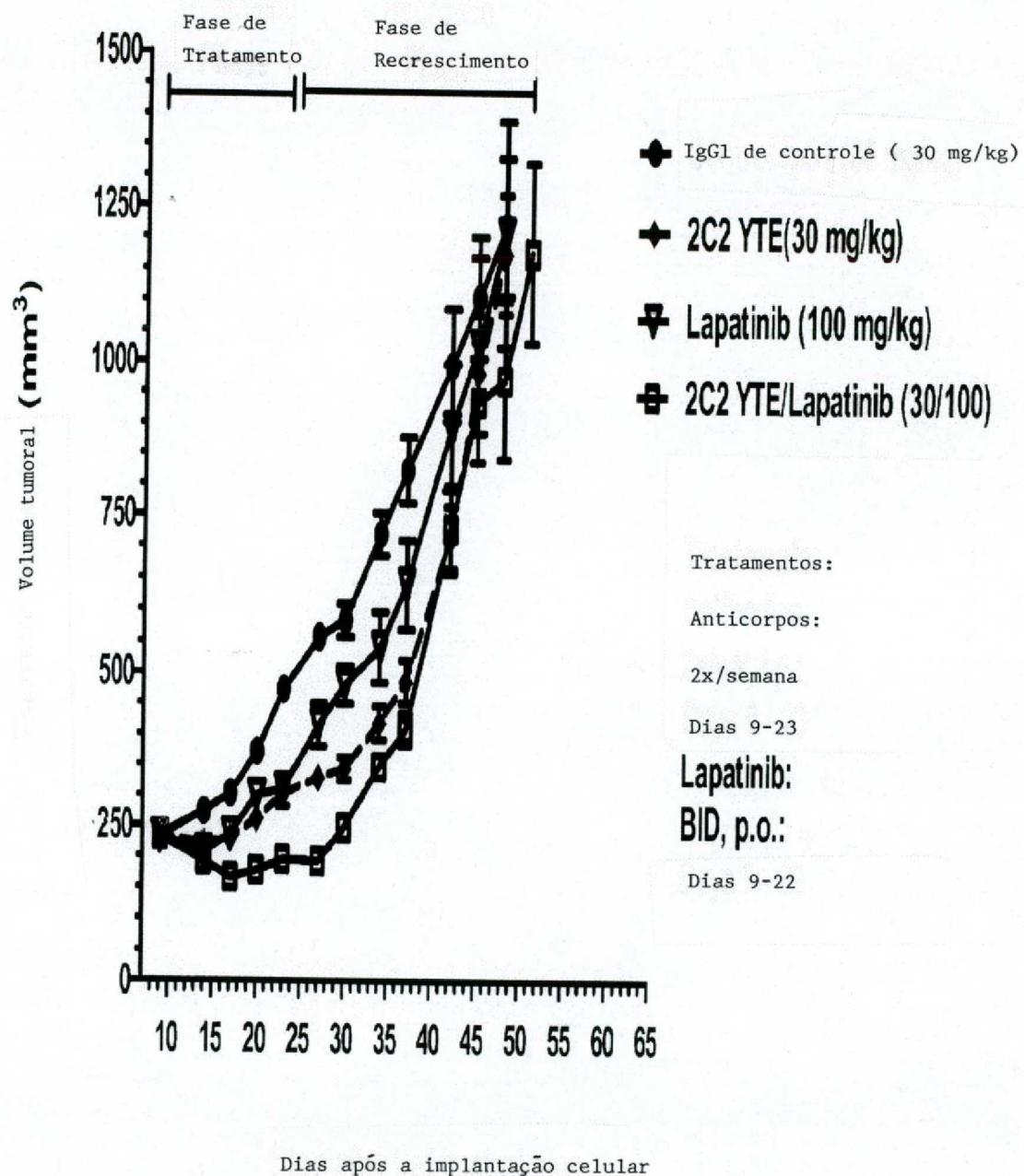


Fig. 34C

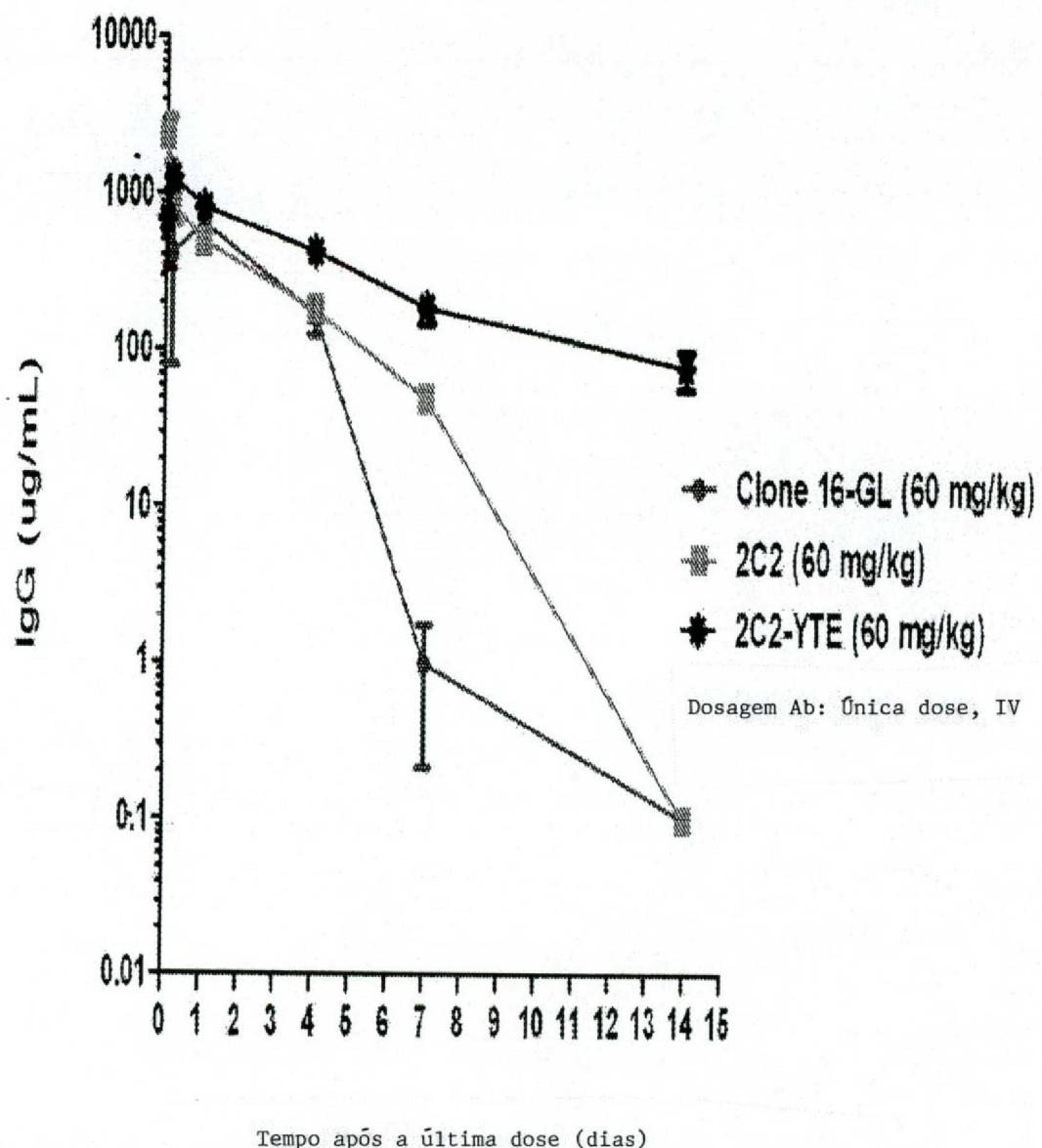


Fig. 35

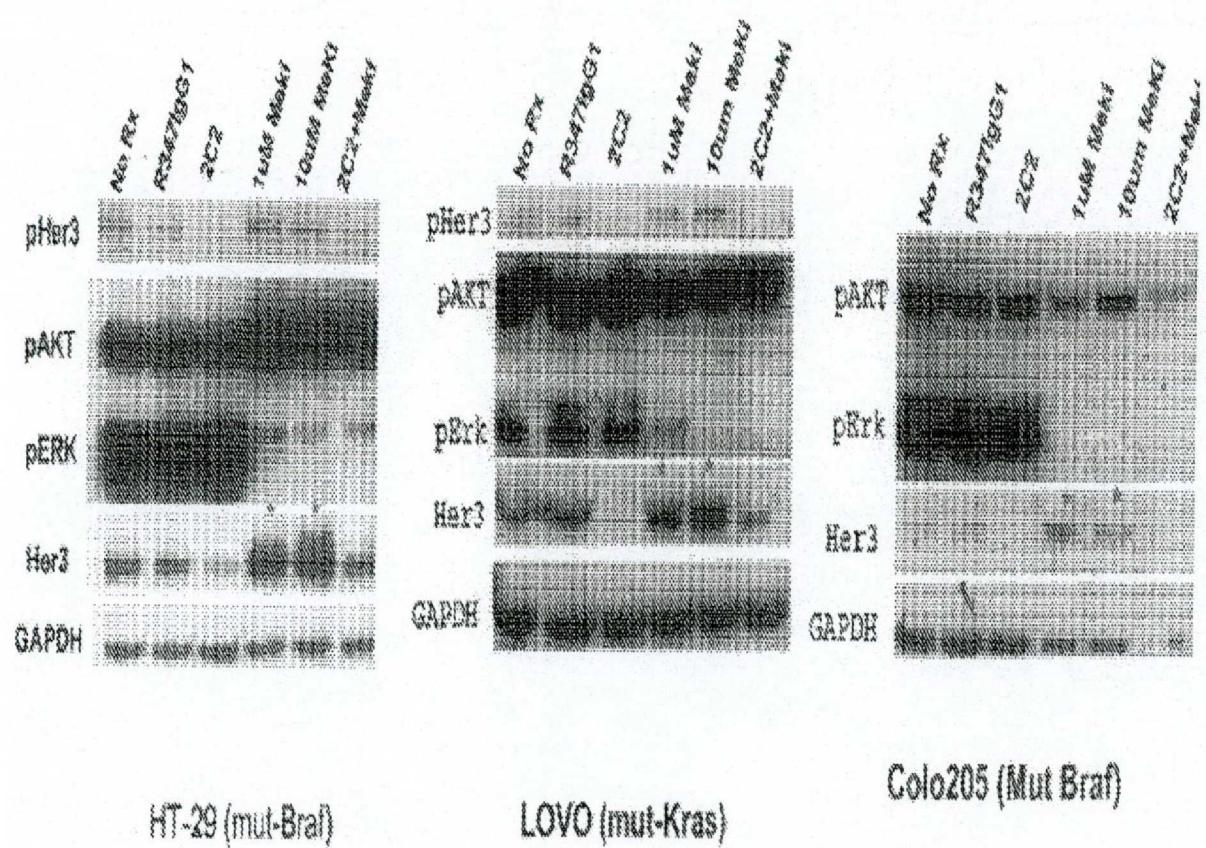


Fig. 36

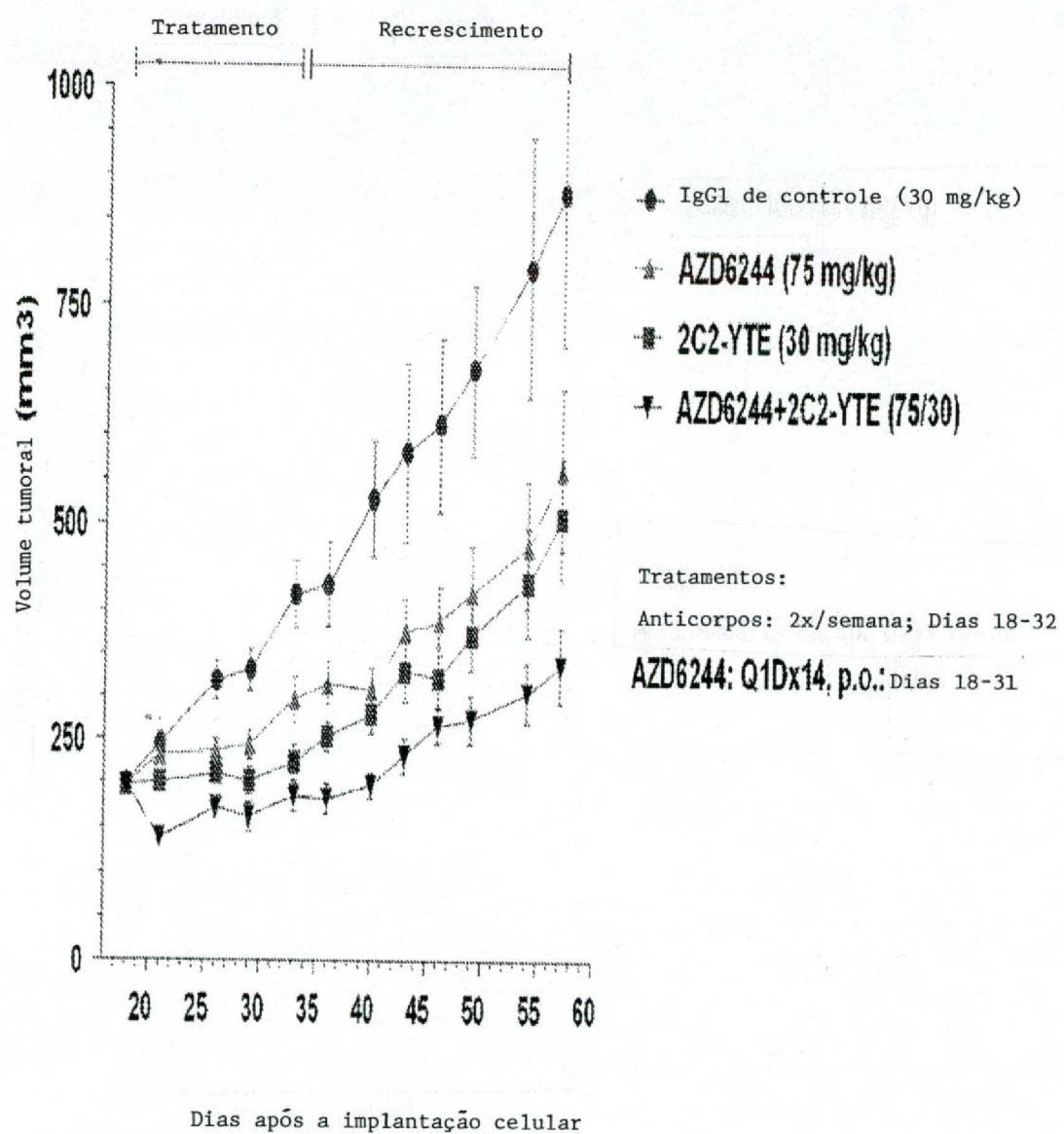


Fig. 37A PARTE I

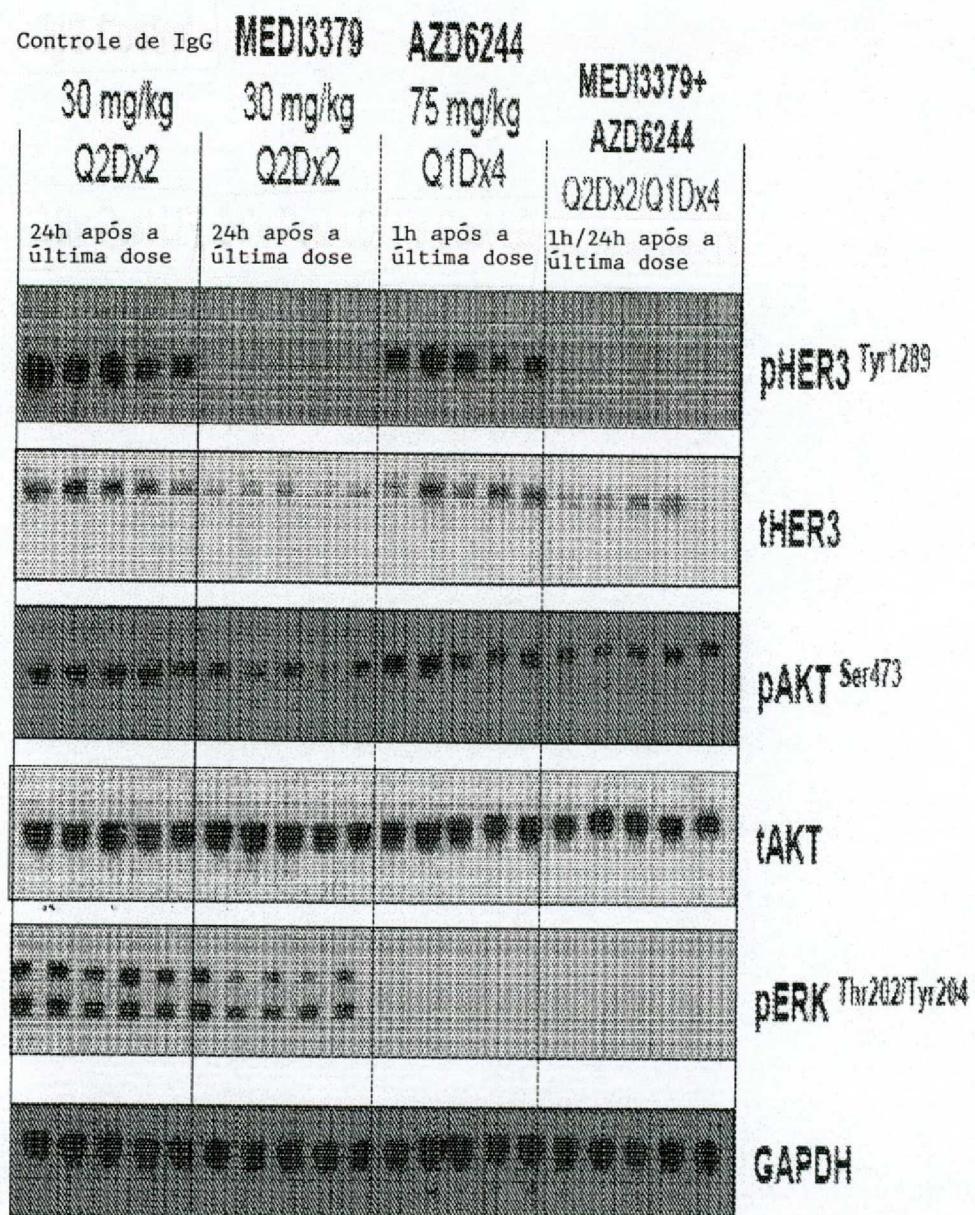


Fig. 37A PARTE II

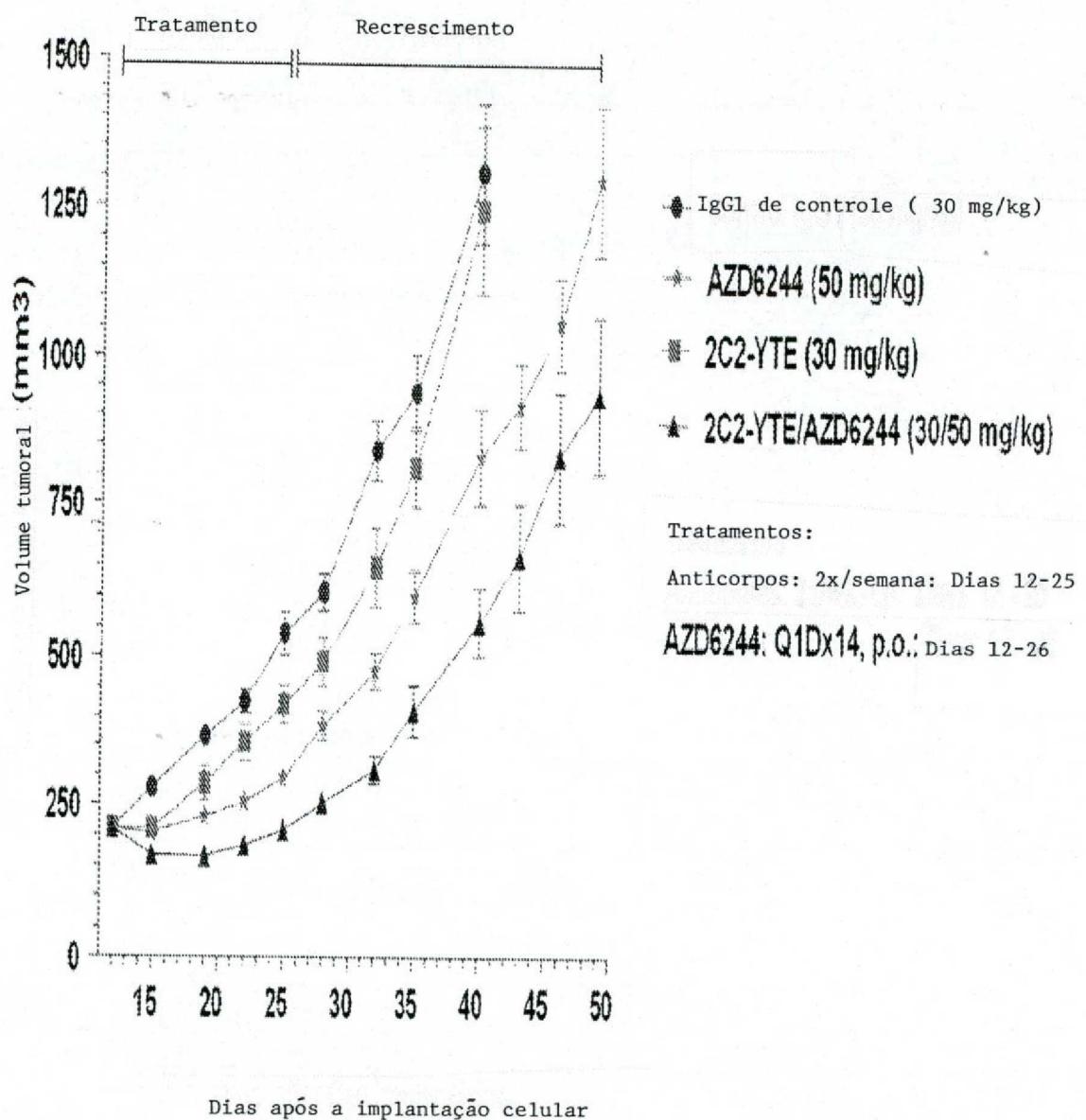
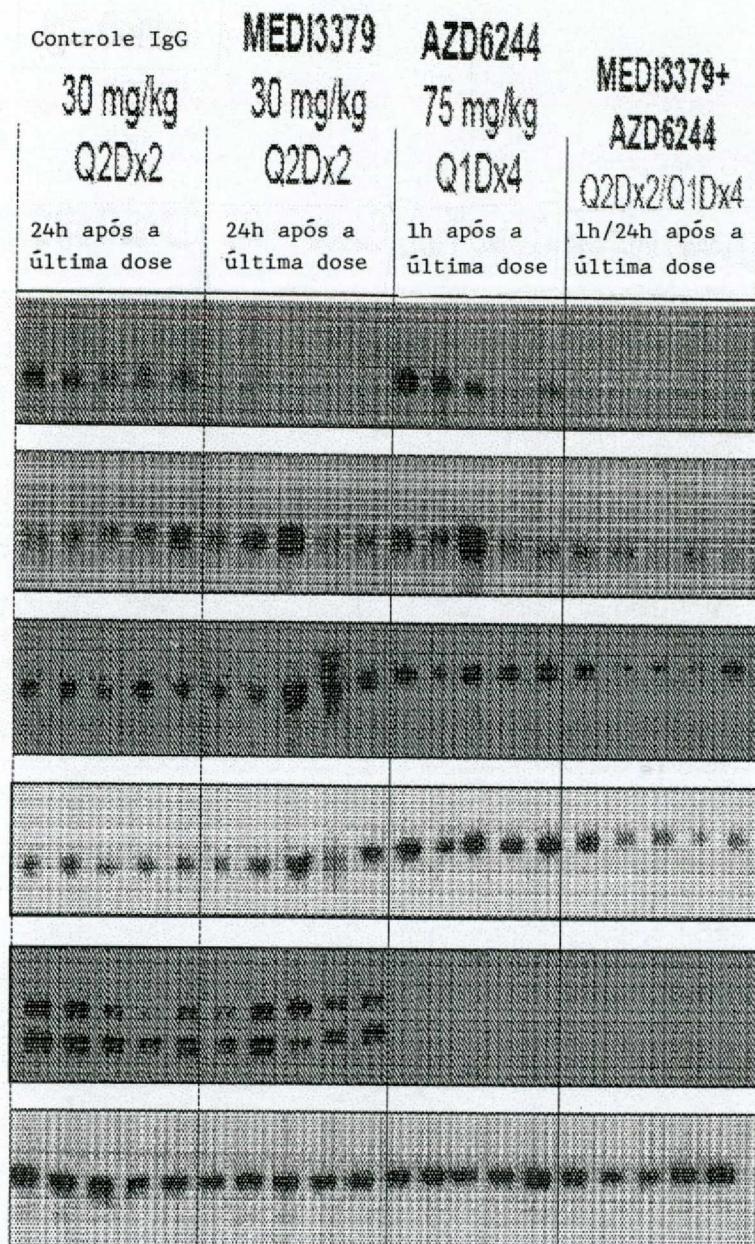


Fig. 37B PARTE I



pHER3 Tyr1289

tHER3

pAKT Ser473

tAkt

pERK Thr202/Tyr204

GAPDH

Fig. 37B PARTE II

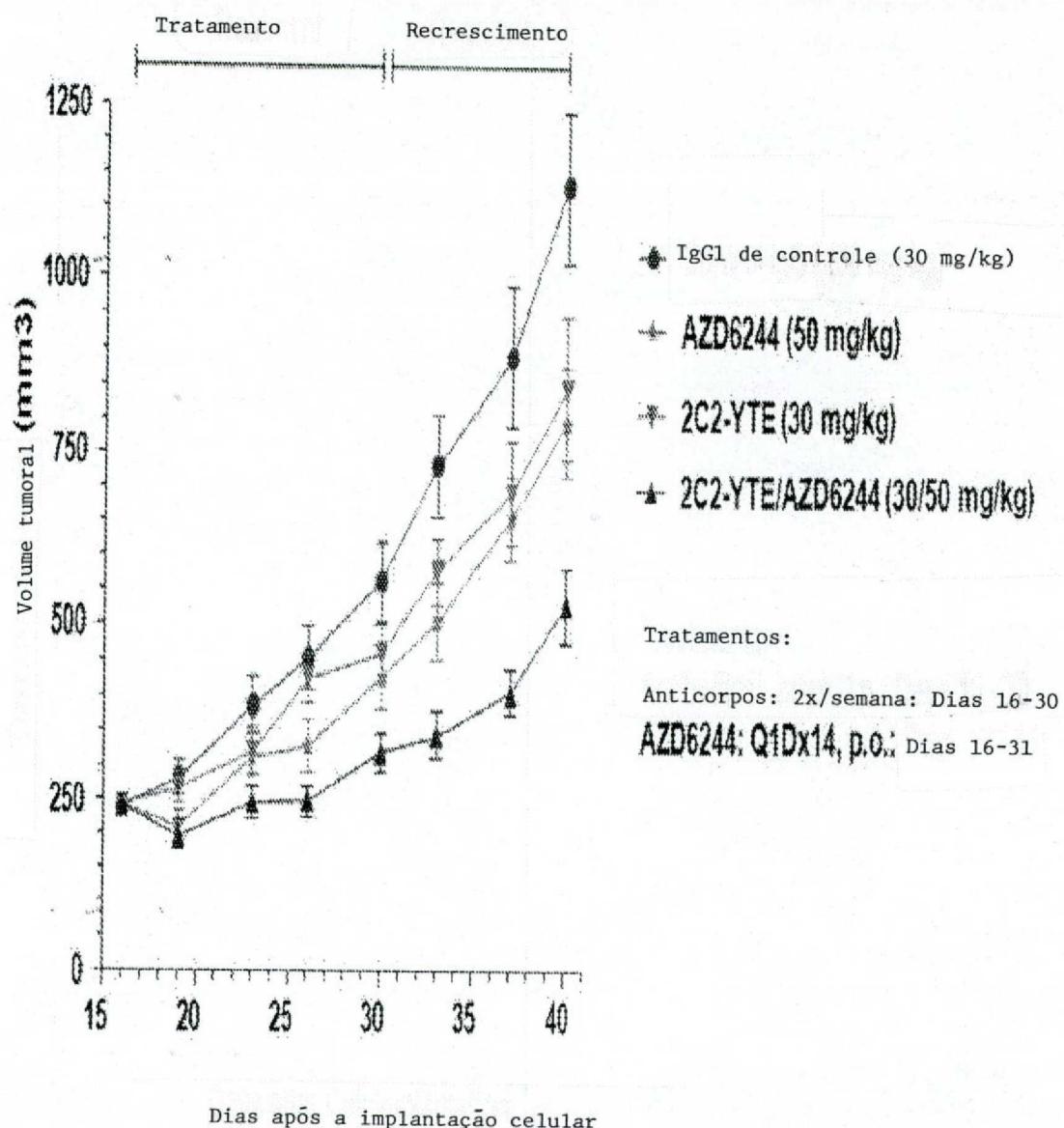


Fig. 37C PARTE I

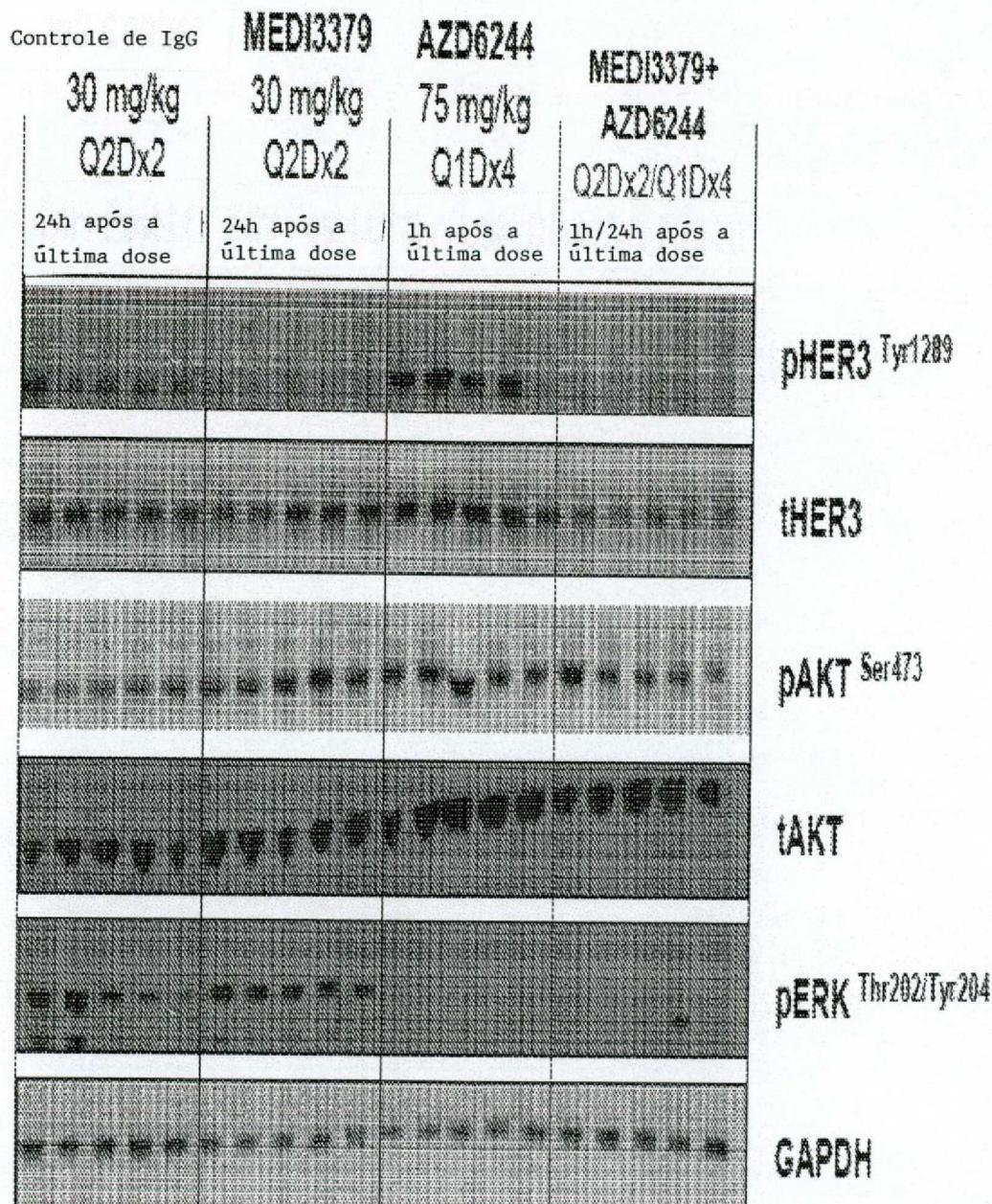


Fig. 37C PARTE II