

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

(21) **PI 0712077-0 A2**

(22) Data de Depósito: 31/05/2007
(43) Data da Publicação: 17/01/2012
(RPI 2141)



(51) *Int.Cl.:*
C13K 1/02
C12P 19/02

(54) **Título:** PROLONGAMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER COM NÍVEIS ELEVADOS DE EGF OU TGF-ALFA

(30) **Prioridade Unionista:** 01/05/2006 US 60/796375

(73) **Titular(es):** Genentech, Inc

(72) **Inventor(es):** Andreas Strauss, F. Hoffman-La Roche Ag, Joachim Moecks, Lukas C. Amler, Nusrat Rabbee

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007031028 de 31/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/130337 de 15/11/2007

(57) **Resumo:** PROLONGAMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER COM NÍVEIS ELEVADOS DE EGF OU TGF-ALFA. A presente invenção refere-se ao prolongamento da sobrevivência em um paciente com câncer, onde o paciente está produzindo um nível elevado de EGF ou TGF-alfa, através de tratamento do paciente com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROLONGAMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER COM NÍVEIS ELEVADOS DE EGF OU TGF-ALFA".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao prolongamento de sobrevivência de um paciente com câncer, onde o paciente está produzindo um nível elevado de EGF ou TGF-alfa, através de tratamento do paciente com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab.

Antecedentes da Invenção

10 Receptores de HER e anticorpos contra o mesmo

A família HER de quinases de tirosina de receptor é um mediador importante de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. A família de receptor inclui quatro membros distintos, incluindo receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB1 ou HER1), HER2 (ErbB2 ou p185^{neu}),
15 HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tyro2).

O EGFR, codificado pelo gene *erbB1*, foi causalmente implicado em malignidade humana. Em particular, expressão aumentada de EGFR tem sido observada câncer de mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago, bem como glioblastomas. Expressão aumentada do receptor de EGFR é frequentemente associada à produção aumentada do ligante de EGFR, fator alfa de crescimento de transformação (TGF- α) pelas mesmas células tumorígenas, resultando em ativação do receptor através de uma via estimulatória autócrina. Baselga e Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64: 127-154 (1994). Anticorpos monoclonais dirigidos contra o EGFR ou seus ligantes,
20 TGF- α e EGF, foram avaliados como agentes terapêuticos no tratamento de tais malignidades. Veja, por exemplo, Baselga e Mendelsohn., *supra*; Masui e colaboradores, *Câncer Research* 44: 1002-1007 (1984); e Wu e colaboradores, *J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995).
25

O segundo membro da família HER, p185^{neu}, foi originalmente
30 identificado como o produto do gene de transformação de neuroblastomas de ratos quimicamente tratados. A forma ativada do proto-oncogene *neu* resulta de uma mutação de ponto (valina para ácido glutâmico) na região

transmembrana da proteína codificada. Amplificação do homólogo humano de *neu* é observada em cânceres de mama e ovariano e se correlaciona com um pobre prognóstico (Slamon e colaboradores, *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon e colaboradores, *Science*, 244: 707-712 (1989); e Pat. US Nº. 4.968.603). Até o momento, nenhuma mutação de ponto análoga àquela no proto-oncogene *neu* foi reportada para tumores humanos. Superexpressão de HER2 (frequentemente, mas não uniformemente, em virtude de amplificação de gene) também foi observada em outros carcinomas, incluindo carcinomas do estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tiróide, pâncreas e bexiga. Veja, dentre outros, King e colaboradores, *Science*, 229: 974 (1985); Yokota e colaboradores, *Lancet*: 1: 765-767 (1986); Fukushima e colaboradores, *Mol Cell Biol*, 6: 955-958 (1986); Guerin e colaboradores, *Oncogene Res.*, 3: 21-31 (1988); Cohen e colaboradores, *Oncogene*, 4: 81-88 (1989); Yonemura e colaboradores, *Câncer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst e colaboradores, *Gynecol. Oncol*, 38: 364 (1990); Weiner e colaboradores, *Câncer Res.*, 50: 421-425 (1990); Kernel e colaboradores, *Câncer Res.*, 50: 5184 (1990); Park e colaboradores, *Câncer Res.*, 49: 6605 (1989); Zhau e colaboradores, *Mol Carcinog.*, 3: 254-257 (1990); Aasland e colaboradores, *Br. J. Câncer* 57: 358-363 (1988); Williams e colaboradores, *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); e McCann e colaboradores, *Câncer*, 65: 88-92 (1990). HER2 pode ser superexpresso em câncer de próstata (Gu e colaboradores, *Câncer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross e colaboradores, *Hum. Pathol.* 28: 827-33 (1997); Ross e colaboradores, *Câncer* 79: 2162-70 (1997); e Sadasivan e colaboradores, *J. Urol* 150: 126-31 (1993)).

Anticorpos dirigidos contra p185^{neu} de rato e os produtos da proteína HER2 humana foram descritos.

Drebin e colaboradores estimularam anticorpos contra o produto do gene *neu* de rato, p185^{neu}. Veja, por exemplo, Drebin e colaboradores, *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers e colaboradores, *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991); e W094/22478. Drebin e colaboradores, *Oncogene* 2: 273-277 (1988) reportam que misturas de anticorpos reativas com duas regiões distintas de p185^{neu} resultam em efeitos anti-tumor sinérgicos sobre células

NIH-3T3 *neu*-transformadas implantadas em camundongos nus. Veja também Patente U.S. 5.824.311 emitida em 20 de Outubro de 1998.

Hudziak e colaboradores, *Mol Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) descrevem a geração de um painel de anticorpos ao HER2 os quais foram

5 caracterizados usando a linhagem de célula de tumor de mama humano SK-BR-3. A proliferação celular relativa das células SK-BR-3 após exposição aos anticorpos foi determinada através de coloração com violeta cristal das monocamadas após 72 horas. Usando esse ensaio, inibição máxima foi ob-

10 tida com o anticorpo denominado 4D5, o qual inibiu a proliferação celular em 56%. Outros anticorpos no painel reduziram a proliferação celular em uma extensão menor nesse ensaio. Descobriu-se ainda que o anticorpo 4D5 sensibiliza linhagens de células de tumor de mama superexpressando HER2 aos efeitos citotóxicos do TNF- α . Veja também Patente U.S. Nº 5.677.171 emitida em 14 de Outubro de 1997. Os anticorpos ao HER2 discutidos em

15 Hudziak e colaboradores são ainda caracterizados em Fendly e colaboradores, *Câncer Research* 50: 1550-1558 (1990); Kotts e colaboradores, *In Vitro* 26(3): 59A (1990); Sarup e colaboradores, *Growth Regulation* 1: 72-82 (1991); Shepard e colaboradores, *J. Clin. Immunol* 11(3): 117-127 (1991); Kumar e colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 11 (2): 979-986 (1991); Lewis e colaboradores, *Câncer Immunol. Immunother.* 37: 255-263 (1993); Pietras e colaboradores, *Oncogene* 9: 1829-1838 (1994); Vitetta e colaboradores, *Câncer Research* 54: 5301-5309 (1994); Sliwkowski e colaboradores, *J. Biol Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 266: 14300-5 (1991); D'souza e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206 (1994); Lewis e colaboradores, *Câncer Research* 56: 1457-1465 (1996); e Schaefer e colaboradores, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997).

20

25

Uma versão humanizada recombinante do anticorpo ao HER2 de murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab ou HERCEPTIN®; Patente U.S. Nº 5.821.337) é clinicamente ativo em pacientes com

30 cânceres de mama metastáticos superexpressando HER2 que receberam terapia anti-câncer extensiva prévia (Baselga e colaboradores, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 (1996)). Trastuzumab recebeu aprovação para comercialização

da administração da comida e fármaco em 25 de Setembro de 1998 para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático cujos tumores expressam a proteína HER2.

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

Triagem por homologia resultou na identificação de dois outros membros da família do receptor de HER: HER3 (Pats. US Nºs 5.183.884 e 5.480.968, bem como Kraus e colaboradores, *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989)) e HER4 (Ped. Pat. EP Nº 599.274; Plowman e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746-1750 (1993); e Plowman e colaboradores, *Nature*, 366: 473-475 (1993)). Ambos esses receptores mostram expressão aumentada sobre pelo menos algumas linhagens de células de câncer de mama.

Os receptores de HER são geralmente encontrados em várias combinações em células e acredita-se que a heterodimerização aumenta a diversidade das respostas celulares a uma variedade de ligantes de HER (Earp e colaboradores, *Breast Câncer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR é ligado por seis ligantes diferentes; o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator alfa de crescimento de transformação (TGF- α), ampiregulina, fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF), betacelulina e epiregulina (Groenen e colaboradores, *Growth Factors* 11:

235-257 (1994)). Uma família de proteínas heregulina resultante de *splicing* alternativo de um único gene são ligantes para HER3 e HER4. A família de heregulina inclui heregulinas alfa, beta e gama (Holmes e colaboradores, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); Patente U.S. Nº 5.641.869; e Schaefer e colaboradores, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)); fatores de diferenciação de neu (NDFs), fatores de crescimento glial (GGFs); atividade de indução do receptor de acetilcolina (ARIA); e fator derivado de neurônio sensorio e motor (SMDF). Para uma revisão, veja Groenen e colaboradores, *Growth Factors*, 11: 235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7: 247-262 (1996) e Lee e colaboradores, *Pharm. Rev.* 47: 51-85 (1995). Recentemente, três ligantes adicionais de HER foram identificados: neuregulina-2 (NRG-2) a qual é reportada como se ligando a HER3 ou HER4 (Chang e colaboradores, *Nature* 387, 509-512 (1997); e Carraway e colaboradores, *Nature* 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 a qual se liga a HER4 (Zhang e colaboradores, *PNAS (USA)* 94(18): 9562-7 (1997)); e neuregulina-4 a qual se liga a HER4 (Harari e colaboradores, *Oncogene* 18: 2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina e epiregulina também se ligam a HER4.

Embora EGF e TGF- α não se liguem a HER2, o EGF estimula EGFR e HER2 a formar um heterodímero, o qual ativa EGFR e resulta em transfosforilação de HER2 no heterodímero. Dimerização e/ou transfosforilação parecem ativar a quinase de tirosina HER2. Veja Earp e colaboradores, *supra*. Da mesma forma, quando HER3 é co-expressa com HER2, um complexo de sinalização ativo é formado e anticorpos dirigidos contra HER2 são capazes de romper esse complexo (Sliwkowski e colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, a afinidade de HER3 pela heregulina (HRG) é aumentada para um estado de maior afinidade quando co-expressa com HER2. Veja também Levi e colaboradores, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); e Lewis e colaboradores, *Câncer Res.*, 56: 1457-1465 (1996) com relação ao complexo de proteína HER2-HER3. HER4, semelhante à HER3, forma um complexo de sinalização ativo com HER2 (Carraway e Cantley, *Cell* 78: 5-8 (1994)).

Publicações de patente relacionadas a anticorpos a HER incluem: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US2002/0192211 A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US2004/0236078 A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, W098/17797, US 6.127.526, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, W099/31140, US2003/0147884 A1, US2003/0170234 A1, US2004/0037823 A1, US2005/0002928 A1, US 6.573.043, US 6.905.830, US2003/0152987 A1, W099/48527, US2002/0141993 A1, US2005/0244417 A1, Patente US Nº 6.949.245, US2003/0086924, US2004/0013667 A1, WO00/69460, US2003/0170235 A1, US 7.041.292, WO01/00238, US2006/0083739, WO01/15730, US 6.627.196 B1, US 6.632.979 B1, WO01/00244, US2002/0001587 A1, US2002/0090662 A1, US 6.984.494 B2, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO—2005/099756, US2006/0013819, WO2006/07398 A1, US2006/0018899, WO 2006/33700, US2006/0088523, US 2006/0034840, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845 A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099 A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685 A1, WO 2005/16968, US2005/0038231 A1, US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494.135 B1, US 5.824.311, EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527 A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US 5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272, US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, US 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO

99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US2002/0192652 A1, US 2003/0211530 A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6.767.541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 e WO 03/86467.

15 Diagnóstico

Pacientes tratados com o anticorpo ao HER2 trastuzumab são selecionados para terapia baseado em superexpressão/amplificação de HER2. Veja, por exemplo, WO99/31140 (Paton e colaboradores), US2003/0170234 A1 (Hellmann, S.) e US2003/0147884 (Paton e colaboradores); bem como WO 1/89566, US2002/0064785 e US2003/0134344 (Mass e colaboradores). Veja também Patente US Nº 6.573.043, Patente US Nº 6.905.83 e US2003/0152987, Cohen e colaboradores, referente à imunohistoquímica (IHC) e hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) para detecção de superexpressão e amplificação de HER2.

O WO2004/053497 e US2004/024815 A1 (Bacus e colaboradores), bem como US 2003/0190689 (Crosby e Smith), referem-se à determinação ou previsão da resposta à terapia com trastuzumab. O US2004/013297A1 (Bacus e colaboradores) refere-se à determinação ou previsão de resposta à terapia com anticorpo a EGFR ABX0303. O WO2004/000094 (Bacus e colaboradores) é dirigido à determinação da resposta ao GW572016, um inibidor de quinase de tirosina de EGFR-HER2 de pequena molécula. O WO2004/063709, Amler e colaboradores, refere-se a biomarca-

dores e métodos para determinação da sensibilidade ao inibidor de EGFR erlotinib HCl. O US2004/0209290 e WO04/065583, Cobleigh e colaboradores, referem-se a marcadores de expressão de gene para o prognóstico de câncer de mama. Veja também WO03/078662 (Baker e colaboradores) e
 5 WO03/040404 (Bevilacqua e colaboradores). O WO02/44413 (Danenbergh, K.) refere-se à determinação de expressão de gene de EGFR e HER2 para determinação de um regime quimioterapêutico.

Pacientes tratados com pertuzumab podem ser selecionados para terapia baseado em ativação ou dimerização de HER. Publicações de pa-
 10 tente referentes ao pertuzumab e seleção de pacientes para terapia com o mesmo incluem: Patente US Nº 6.949.245, WO01/00245, US2005/0208043, US2005/0238640, US2006/0034842 e US2006/0073143 (Adams e colaboradores); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667 A1 (Sliwkowski, M.); bem como WO2004/008099 A2 e US2004/0106161 (Bossenmaier e co-
 15 laboradores).

Cronin e colaboradores, *Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004) descrevem a medição de expressão de gene em tecidos incrustados em parafina armazenados. Ma e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 607-616 (2004) descrevem caracterização de perfil genético através de microarranjo com oligo-
 20 nucleotídeo genético usando RNA isolado de seções de tecido de tumor tomadas de biópsias primárias armazenadas.

O pertuzumab (também conhecido como anticorpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG®, Genentech, Inc., South San Francisco) representa o primeiro de uma nova classe de agentes conhecidos
 25 como inibidores de dimerização de HER (HDI) e funciona para inibir a capacidade de HER2 de formar heterodímeros ativos com outros receptores de HER (tais como EGFR/HER1, HER3 e HER4) e é ativo a despeito dos níveis de expressão de HER2. Veja, por exemplo, Harari e Yarden, *Oncogene* 19: 6102-14 (2000); Yarden e Sliwkowski, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-37 (2001); Sliwkowski, *Nat Struct Biol* 10: 158-9 (2003); Cho e colaboradores, *Nature* 421: 756-60 (2003); e Malik e colaboradores, *Pro Am Soc Câncer Res* 44: 176-7 (2003).
 30

Foi demonstrado que o bloqueio, pelo pertuzumab, da formação de heterodímeros de HER2-HER3 em células tumorígenas inibe a sinalização celular crítica, o que resulta em proliferação e sobrevivência reduzidas do tumor (Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-37 (2002)).

5 O pertuzumab tem sofrido testagem como um agente único na clínica com um experimento em fase Ia em pacientes com cânceres avançados e experimentos em fase II em pacientes com câncer ovariano e câncer de mama, bem como câncer de pulmão e próstata. Em um estudo em Fase I, pacientes com tumores sólidos incuráveis, localmente avançados, recor-

10 rentes ou metastáticos que tinham progredido durante ou após terapia padrão foram tratados com pertuzumab fornecido intravenosamente a cada 3 semanas. O pertuzumab foi, em geral, bem tolerado. Regressão de tumor foi obtida em 3 de 20 pacientes cuja resposta foi avaliada. Dois pacientes tiveram respostas parciais confirmadas. Doença estável durante mais de 2,5

15 meses foi observada em 6 de 21 pacientes (Agus e colaboradores, *Pro Am Soc Clin Oncol* 22: 192 (2003)). Em doses de 2,0-15 mg/kg, a farmacocinética do pertuzumab foi linear e a liberação média oscilava de 2,69 a 3,74 mL/dia/kg e a meia-vida de eliminação terminal média oscilava de 15,3 a 27,6 dias. Anticorpos ao pertuzumab não foram detectados (Allison e colabo-

20 radores, *Pro Am Soc Clin Oncol* 22: 197(2003)).

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona os dados clínicos de pacientes com câncer humano tratados com um inibidor de dimerização de HER, pertuzumab. Os pacientes foram avaliados com relação aos níveis de expres-

25 são de vários biomarcadores no soro e a correlação entre tais níveis de expressão e o benefício clínico em resposta ao tratamento com trastuzumab foi avaliada. Os dados clínicos indicaram que pacientes com câncer ovariano que produzem níveis elevados de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) mostraram benefícios

30 para a sobrevivência com relação a pacientes com níveis normais de EGF ou TGF-alfa, em resposta ao tratamento com pertuzumab. Benefícios similares foram esperados em outro experimento clínico em andamento, incluindo

pacientes com câncer ovariano resistente à platina, câncer peritoneal primário e do tubo falopiano.

Consequentemente, em um aspecto, a invenção refere-se a um método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer compreendendo administração de um inibidor de dimerização de HER ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) e o câncer é selecionado do grupo consistindo de câncer ovariano, câncer peritoneal e câncer do tubo falopiano.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo falopiano compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para prolongar a sobrevivência isenta de progressão (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo falopiano compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que é determinado que o soro do paciente tem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) no mesmo.

Em ainda um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para prolongar a sobrevivência isenta de progressão (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo falopiano compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que é determinado que o soro do paciente tem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) no mesmo.

Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um método de seleção de um paciente para tratamento com um inibidor de dimerização de

HER compreendendo tratamento do paciente com o inibidor de dimerização de HER se é determinado que o paciente produz um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

5 Para todos os aspectos, em uma modalidade particular, descobriu-se que o paciente tem um nível elevado de EGF no soro.

Em outra modalidade, descobriu-se que o paciente tem um nível elevado de TGF-alfa no soro.

10 Em outra modalidade, o inibidor de dimerização de HER inibe a heterodimerização de HER.

Em uma outra modalidade, o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER o qual pode, por exemplo, se ligar a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EGFR, HER2 e HER3.

15 Em uma modalidade particular, o anticorpo se liga a HER2, tal como o Domínio II do domínio extracelular de HER2 ou a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

Em uma modalidade específica, o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

20 O câncer pode ser, por exemplo, câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente, câncer ovariano resistente à platina, câncer peritoneal primário ou do tubo falopiano.

O inibidor de dimerização de HER pode ser administrado como um agente anti-tumor único ou em combinação com um segundo agente terapêutico ao paciente.

25 O segundo agente terapêutico pode ser, por exemplo, um agente quimioterapêutico, um anticorpo ao HER, um anticorpo dirigido contra um antígeno tumor-associado, um composto anti-hormonal, um cardioprotetor, uma citocina, um fármaco EGFR-objetivado, um agente anti-angiogênico, um inibidor de quínase de tirosina, um inibidor de COX, um fármaco anti-inflamatório não esteroide, um inibidor de farnesil transferase, um anticorpo
30 que se liga à proteína oncofetal CA 125, vacina de HER2, uma terapia de objetivação de HER, um inibidor de Raf ou Ras, uma doxorubicina lipossô-

mica, um topotecan, um taxano, um inibidor duplo de quinase de tirosina, TLK286, EMD-7200, um medicamento que trata náusea, um medicamento que previne ou trata rash cutâneo ou terapia padrão para acne, um medicamento que trata ou previne diarreia, um medicamento para redução da temperatura corporal ou um fator de crescimento hematopoiético.

Em uma modalidade particular, o segundo agente terapêutico é um agente quimioterapêutico, tal como um agente quimioterapêutico anti-metabólito, por exemplo, gemcitabina, trastuzumab, erlotinib ou bevacizumab.

O benefício clínico é, de preferência, medido em termos de sobrevivência, incluindo sobrevivência global (OS) e sobrevivência isenta de progressão (PFS), de preferência PFS.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um kit compreendendo um inibidor de dimerização de HER e uma bula ou rótulo na embalagem indicando um benefício clínico para o inibidor de dimerização de HER se o paciente a ser tratado produz um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa), em que o benefício clínico é, de preferência, sobrevivência prolongada, em particular PFS prolongada.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de promoção de um inibidor de dimerização de HER para tratar pacientes que produzem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa), onde a promoção pode tomar quaisquer formas, incluindo a forma de um material escrito, tal como uma bula na embalagem.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 proporciona um esquema da estrutura da proteína HER2 e sequências de aminoácido para os Domínios I-IV (SEQ ID N°s 19-22, respectivamente) do domínio extracelular da mesma.

As figuras 2A e 2B representam alinhamentos das sequências de aminoácido dos domínios variável de cadeia leve (V_L) (figura 2A) e variável de cadeia pesada (V_H) (figura 2B) do anticorpo monoclonal de murino

2C4 (SEQ ID N°s 1 e 2, respectivamente); os domínios V_L e V_H da variante 574/pertuzumab (SEQ ID N°s 3 e 4, respectivamente) e estrutura de consenso de VL e VH humana (hum κ 1, subgrupo I kappa leve; humIII, subgrupo III pesada) (SEQ ID N°s 5 e 6, respectivamente). Os asteriscos identificam diferenças entre os domínios variáveis do pertuzumab e do anticorpo monoclonal de murino 2C4 ou entre domínios variáveis do pertuzumab e a estrutura humana. Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs) estão entre parênteses.

As figuras 3A e 3B mostram as sequências de aminoácido da cadeia leve do pertuzumab (figura 3 A; SEQ ID N° 13) e cadeia pesada (figura 3B; SEQ ID N° 14). CDRs são mostradas em negrito. A massa molecular calculada da cadeia leve e da cadeia pesada é de 23.526,22 Da e 49.216,56 Da (cisteínas na forma reduzida). A porção de carboidrato está presa a Asn 299 da cadeia pesada.

A figura 4 representa, esquematicamente, a ligação de 2C4 ao sítio de ligação heterodimérica de HER2, desse modo, impedindo a heterodimerização com EGFR ou HER3 ativada.

A figura 5 representa o acoplamento de HER2/HER3 às vias de MAPK e Akt.

A figura 6 compara várias atividades do trastuzumab e pertuzumab.

As figuras 7A e 7B mostram as sequências de aminoácido da cadeia leve do trastuzumab (figura 7A; SEQ ID N° 15) e cadeia pesada (figura 7B; SEQ ID N° 16), respectivamente.

As figuras 8A e 8B representam uma sequência de cadeia leve do pertuzumab variante (figura 8A; SEQ ID N° 17) e uma sequência de cadeia pesada do pertuzumab variante (figura 8B; SEQ ID N° 18), respectivamente.

A figura 9 representa a correlação de Spearman entre os biomarcadores HER2, TGF-alfa, ampiregulina e EGF.

A figura 10 representa a média/correlação de marcadores com co-variáveis clínicas.

A figura 11 mostra a determinação de limite de corte ("cutoff") usando a sobrevivência isenta de progressão (PFS) para HER2, TGF-alfa, ampiregulina e EGF.

5 A figura 12 mostra a determinação de limite de corte usando a sobrevivência global (OS) para HER2, TGF-alfa, ampiregulina e EGF.

A figura 13 reflete a distribuição de pacientes de acordo com os limite de cortes.

10 A figura 14 representa as curvas de PFS e OS de Kaplan Meir separadas por 3 marcadores de limite de corte determinados na análise uni-variável para o marcador HER2.

A figura 15 representa as curvas de PFS e OS de Kaplan Meir separadas por 3 marcadores de limite de corte determinados na análise uni-variável para o marcador TGF-alfa.

15 A figura 16 representa as curvas de PFS e OS de Kaplan Meir separadas por 3 marcadores de limite de corte determinados na análise uni-variável para o marcador EGF.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

I. Definições

20 "Sobrevivência" refere-se à vida restante do paciente e inclui sobrevivência global, bem com sobrevivência isenta de progressão.

"Sobrevivência global" refere-se à vida restante do paciente durante um período de tempo definido, tal como 1 ano, 5 anos, etc. a partir do momento de diagnóstico ou tratamento.

25 "Sobrevivência isenta de progressão" refere-se à vida restante do paciente, sem a progressão ou piora do câncer.

30 Por "prolongamento de sobrevivência" entenda-se aumento na sobrevivência global ou isenta de progressão em um paciente tratado com relação a um paciente não tratado (isto é, com relação a um paciente não tratado com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab) ou com relação a um paciente que não mostra ativação de HER e/ou com relação a um paciente tratado com um agente anti-tumor aprovado (tal como topotecan ou doxorubicina lipossômica, onde o câncer é câncer ovariano).

Aqui, "tempo para progressão da doença" ou "TTP" refere-se ao tempo, geralmente medido em semanas ou meses, para o momento de tratamento inicial (por exemplo, com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab) até que o câncer progrida ou piore. Tal progressão pode ser avaliada pelo clínico habilitado. No caso de câncer ovariano, por exemplo, a progressão pode ser avaliada através do RECIST (vejam por exemplo, Therasse e colaboradores, *J. Nat. Câncer Inst.* 92(3): 205-216 (2000)).

Por "prolongamento de TTP" entenda-se aumento do tempo para progressão da doença em um paciente tratado com relação a um paciente não tratado (isto é, com relação a um paciente não tratado com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab) ou com relação a um paciente que não mostra ativação de HER e/ou com relação a um paciente tratado com um agente anti-tumor aprovado (tal como topotecan ou doxorubicina lipossômica, onde o câncer é câncer ovariano).

Uma "resposta objetiva" refere-se a uma resposta mensurável, incluindo resposta completa (CR) ou resposta parcial (PR).

Por "resposta completa" ou "CR" entenda-se o desaparecimento de todos os sinais de câncer em resposta ao tratamento. Isso nem sempre significa que o câncer tenha sido curado.

"Resposta parcial" ou "PR" refere-se a uma diminuição no tamanho de um ou mais tumores ou lesões ou na extensão do câncer no corpo, em resposta ao tratamento.

Um "receptor de HER" é uma quinase de tirosina de proteína de receptor a qual pertence à família do receptor de HER e inclui os receptores de EGFR, HER2, HER3 e HER4. O receptor de HER geralmente compreenderá um domínio extracelular, o qual pode se ligar a um ligante de HER e/ou dimerizar com outra molécula de receptor de HER; um domínio transmembrana lipofílico; um domínio de quinase de tirosina intracelular conservado; e um domínio de sinalização carboxi-terminal abrigando vários resíduos de tirosina os quais podem ser fosforilados. O receptor de HER pode ser um receptor de HER com "sequência nativa" ou uma "variante de sequência de aminoácido" do mesmo. De preferência, o receptor de HER é um receptor de

HER humano com sequência nativa.

Os termos "ErbB1," "HER1", "receptor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são usados permutavelmente aqui e referem-se ao EGFR conforme descrito, por exemplo, em Carpenter e colaboradores, *Ann. Rev. Biochem.* 56: 881-914 (1987), incluindo formas mutantes que ocorrem naturalmente do mesmo (por exemplo, um EGFR mutante com deleção conforme em Humphrey e colaboradores, *PNAS (USA)* 87: 4207-4211 (1990)). *erbB1* refere-se ao gene que codifica o produto da proteína de EGFR.

As expressões "ErbB2" e "HER2" são usadas permutavelmente aqui e referem-se à proteína HER2 descrita, por exemplo, em Semba e colaboradores, *PNAS (USA)* 82: 6497-6501 (1985) e Yamamoto e colaboradores, *Nature* 319: 230-234 (1986) (número de acesso ao Genbank X03363). O termo "*erbB2*" refere-se ao gene que codifica a ErbB2 humana e "*neu*" refere-se ao gene que codifica p185^{neu} de rato. HER2 preferida é HER2 humana de sequência nativa.

Aqui, "domínio extracelular de HER2" ou "ECD de HER2" refere-se a um domínio de HER2 que está fora de uma célula, quer ancorado a uma membrana celular ou em circulação, incluindo fragmentos do mesmo. Em uma modalidade, o domínio extracelular de HER2 pode compreender quatro domínios: "Domínio I" (resíduos de aminoácido de cerca de 1-195; SEQ ID NO: 19), "Domínio II" (resíduos de aminoácido de cerca de 196-319; SEQ ID NO: 20), "Domínio III" (resíduos de aminoácido de cerca de 320-488; SEQ ID NO: 21) e "Domínio IV" (resíduos de aminoácido de cerca de 489-630; SEQ ID NO: 22) (numeração de resíduo sem peptídeo sinalizador). Veja Garrett e colaboradores, *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho e colaboradores, *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328 (2004) e Plowman e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1746-1750 (1993), bem como figura 1 aqui.

"ErbB3" e "HER3" referem-se ao polipeptídeo receptor conforme descrito, por exemplo, nas Pats. US N°s 5.183.884 e 5.480.968, bem como em Kraus e colaboradores, *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989).

Os termos "ErbB4" and "HER4" referem-se aqui ao polipeptídeo

receptor conforme descrito, por exemplo, no Ped. de Pat. EP N° 599.274; Plowman e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746-1750 (1993); e Plowman e colaboradores, *Nature*, 366: 473-475 (1993), incluindo isoformas do mesmo, por exemplo, conforme descrito no W099/19488, publicado em 22 de Abril de 1999.

Por "ligante de HER" entenda-se um polipeptídeo o qual se liga a e/ou ativa um receptor de HER. O ligante de HER de interesse particular aqui é um ligante de HER humano de sequência nativa, tal como fator de crescimento epidérmico (EGF) (Savage e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 247: 7612-7621 (1972)); fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) (Marquardt e colaboradores, *Science* 223: 1079-1082 (1984)); ampiregulina, também conhecida como schwanoma ou fator de crescimento autócrino de queratinócito (Shoyab e colaboradores, *Science* 243: 1074-1076(1989); Kimura e colaboradores, *Nature* 348: 257-260 (1990); e Cook e colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 11: 2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing e colaboradores, *Science* 259: 1604-1607 (1993); e Sasada e colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF) (Higashiyama e colaboradores, *Science* 251: 936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 270: 7495-7500 (1995); e Komurasaki e colaboradores, *Oncogene* 15: 2841-2848 (1997)); uma heregulina (veja abaixo); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway e colaboradores, *Nature* 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari e colaboradores, *Oncogene* 18: 2681-89 (1999)); e cripto (CR-1) (Kannan e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 272(6): 3330-3335 (1997)). Ligantes de HER os quais se ligam ao EGFR incluem EGF, TGF- α , ampiregulina, betacelulina, HB-EGF e epiregulina. Ligantes de HER os quais se ligam a HER3 incluem heregulinas. Ligantes de HER capazes de ligação a HER4 incluem betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 e heregulinas.

"Heregulina" (HRG), quando usada aqui, refere-se a um polipeptídeo codificado pelo produto do gene de heregulina, conforme descrito na

Patente U.S. Nº 5.641.869 ou Marchionni e colaboradores, *Nature*, 362: 312-318 (1993). Exemplos de heregulinas incluem heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 e heregulina- β 3 (Holmes e colaboradores, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); e Patente U.S. Nº 5.641.869); fator de diferenciação de *neu* (NDF) (Peles e colaboradores, *Cell* 69: 205-216 (1992)); atividade de indução do receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls e colaboradores, *Cell* 72: 801-815 (1993)); fatores de crescimento glial (GGFs) (Marchionni e colaboradores, *Nature*, 362: 312-318 (1993)); fator derivado de neurônio sensorio e motor (SMDF) (Ho e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 270: 14523-14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer e colaboradores, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)).

Um "dímero de HER" aqui é um dímero não covalentemente associado compreendendo pelo menos dois receptores de HER. Tais complexos podem se formar quando uma célula expressando dois ou mais receptores de HER é exposta a um ligante de HER e pode ser isolada através de imunoprecipitação e analisada através de SDS-PAGE, conforme descrito em Sliwkowski e colaboradores, *J. Biol Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994), por exemplo. Outras proteínas, tal como uma subunidade do receptor de citocina (por exemplo, gp130), podem estar associadas ao dímero. De preferência, o dímero de HER compreender HER2.

Um "heterodímero de HER" aqui é um heterodímero não covalentemente associado compreendendo pelo menos dois receptores de HER diferentes, tais como heterodímeros de EGFR-HER2, HER2-HER3 ou HER2-HER4.

Um "inibidor de HER" é um agente o qual interfere com ativação ou função de HER. Exemplos de inibidores de HER incluem anticorpos a HER (por exemplo, anticorpos a EGFR, HER2, HER3 ou HER4); fármacos EGFR-objetivados; antagonistas de HER de pequena molécula; inibidores de quinase de tirosina de HER; inibidores duplos de quinase de tirosina de HER2 e EGFR, tal como lapatinib/GW572016; moléculas anti-senso (veja, por exemplo, WO2004/87207); e/ou agentes que se ligam a ou interferem com a função de moléculas de sinalização a jusante, tais como MAPK ou Akt (veja figura 5). De preferência, o inibidor de HER é um anticorpo ou pequena

molécula a qual se liga a um receptor de HER.

Um "inibidor de dimerização de HER" é um agente o qual inibe a formação de um dímero de HER ou heterodímero de HER. De preferência, o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo, por exemplo, um anticorpo o qual se liga a HER2 no sítio de ligação heterodimérica do mesmo. O inibidor de dimerização de HER mais preferido aqui é pertuzumab ou MAb 2C4. A ligação de 2C4 ao sítio de ligação heterodimérica de HER2 é ilustrada na figura 4. Outros exemplos de inibidores de dimerização de HER incluem anticorpos os quais se ligam ao EGFR e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais receptores de HER (por exemplo, anticorpo monoclonal ao EGFR 806, MAb 806, o qual se liga ao EGFR ativado ou "não unido"; veja Johns e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 279(29): 30375-30384 (2004)); anticorpos os quais se ligam a HER3 e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais de outros receptores de HER; anticorpos os quais se ligam a HER4 e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais de outros receptores de HER; inibidores de dimerização de peptídeo (Patente US Nº 6.417.168); inibidores de dimerização anti-senso, etc.

Um "inibidor de dimerização de HER2" é um agente que inibe a formação de um dímero ou heterodímero compreendendo HER2.

Um "anticorpo ao HER2" é um anticorpo que se liga a um receptor de HER. Opcionalmente, o anticorpo ao HER ainda interfere com ativação ou função de HER. De preferência, o anticorpo ao HER se liga ao receptor HER2. Um anticorpo ao HER2 de interesse particular aqui é pertuzumab. Outro exemplo de um anticorpo ao HER2 é trastuzumab. Exemplos de anticorpos ao EGFR incluem cetuximab e ABX0303.

"Ativação de HER" refere-se à ativação ou fosforilação de qualquer um ou mais dos receptores de HER. Geralmente, ativação de HER resulta em transdução de sinal (por exemplo, aquela causada por um domínio de quinase intracelular de fosforilação de resíduos de tirosina do receptor de HER no receptor de HER ou um polipeptídeo substrato). Ativação de HER pode ser mediada através de ligação ao ligante de HER a um dímero de HER compreendendo o receptor de HER de interesse. Ligação do ligante de

HER a um dímero de HER pode ativar um domínio de quinase de um ou mais dos receptores de HER no dímero e, desse modo, resulta em fosforilação de resíduos de tirosina em um ou mais dos receptores de HER e/ou fosforilação de resíduos de tirosina em polipeptídeo(s) substrato adicional(is), tais como quinases intracelulares Akt ou MAPK; veja figura 5, por exemplo.

"Fosforilação" refere-se à adição de um ou mais grupos fosfato a uma proteína, tal como um receptor de HER ou substrato do mesmo.

Um anticorpo o qual "inibe a dimerização de HER" é um anticorpo o qual inibe ou interfere com a formação de um dímero de HER. De preferência, tal anticorpo se liga ao HER2 no sítio de ligação heterodimérica do mesmo. O anticorpo de inibição de dimerização mais preferido aqui é pertuzumab ou MAb 2C4. A ligação de 2C4 ao sítio de ligação heterodimérica de HER2 é ilustrada na figura 4. Outros exemplos de anticorpos os quais inibem a dimerização de HER incluem anticorpos os quais se ligam ao EGFR e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais de outros receptores de HER (por exemplo, anticorpo monoclonal ao EGFR 806, MAb 806, o qual se liga ao EGFR ativado ou "não unido"; veja Johns e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 279(29): 30375-30384 (2004)); anticorpos os quais se ligam ao HER3 e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais de outros receptores de HER; e anticorpos os quais se ligam ao HER4 e inibem a dimerização do mesmo com um ou mais de outros receptores de HER.

Um anticorpo o qual "bloqueia a ativação de ligante de um receptor de HER mais eficazmente do que o trastuzumab" é um o qual reduz ou elimina a ativação de ligante de HER do(s) receptor(es) de HER ou dímero(s) de HER mais eficazmente (por exemplo, pelo menos cerca de 2 vezes mais eficazmente) do que o trastuzumab. De preferência, tal anticorpo bloqueia a ativação do ligante de HER de um receptor de HER pelo menos cerca de tão eficazmente quanto o anticorpo monoclonal de murino 2C4 ou um fragmento Fab do mesmo ou quanto o pertuzumab ou um fragmento Fab do mesmo. Pode-se avaliar a capacidade de um anticorpo de bloquear a ativação de ligante de um receptor de HER estudando dímeros de HER diretamente ou avaliando a ativação de HER ou sinalização a jusante, a qual re-

sulta de dimerização de HER e/ou avaliando o sítio de ligação de anticorpo-HER2, etc. Ensaios para seleção de anticorpos com a capacidade de inibir a ativação de ligante de um receptor de HER mais eficazmente do que o trastuzumab são descritos em Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002) e Patente US Nº 6.949.245 (Adams e colaboradores). À guisa de exemplo apenas, se pode ensaiar: a inibição de formação de dímero de HER (veja, por exemplo, figuras 1A-B de Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002); e Patente US Nº 6.949.245); a redução na ativação de ligante de HER de células as quais expressam dímeros de HER (Patente US Nº 6.949.245 e figuras 2A-B de Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo); o bloqueio de ligação de ligante de HER à células as quais expressam dímeros de HER (Patente US Nº 6.949.245 e figura 2E de Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo); a inibição de crescimento celular de células cancerígenas (por exemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) as quais expressam dímeros de HER na presença (ou ausência) de ligante de HER (Patente US Nº 6.949.245 e figuras 3A-D de Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo); a inibição de sinalização a jusante (por exemplo, inibição de fosforilação de AKT HRG-dependente ou inibição de fosforilação de MAPK HRG- ou TGF α -dependente) (veja Patente US Nº 6.949.245 e figuras 2C-D de Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002), por exemplo). Se pode também avaliar se o anticorpo inibe a dimerização de HER estudando o sítio de ligação de anticorpo-HER2, por exemplo, avaliando uma estrutura ou modelo, tal como uma estrutura de cristal do anticorpo ligado ao HER2 (veja, por exemplo, Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328 (2004)).

Um "sítio de ligação heterodimérica" sobre HER2 refere-se a uma região no domínio extracelular de HER2 que contata ou interfere com uma região no domínio extracelular de EGFR, HER3 ou HER4 quando de formação de um dímero com a mesma. A região é encontrada no Domínio II de HER2. Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328 (2004).

O anticorpo ao HER2 pode "inibir a fosforilação de AKT HRG-

dependente" e/ou "inibir a fosforilação de MAPK HRG- ou TGF α -dependente" mais eficazmente (por exemplo, pelo menos 2 vezes mais eficazmente) do que o trastuzumab (veja Agus e colaboradores, *Câncer Cell* 2: 127-137 (2002) e Patente US Nº 6.949.245 à guisa de exemplo).

5 O anticorpo ao HER2 pode ser um o qual, tal como o pertuzumab, "não inibe clivagem do ectodomínio de HER2" (Molina e colaboradores, *Câncer Res.* 61: 4744-4749(2001)). O trastuzumab, por outro lado, pode inibir clivagem do ectodomínio de HER2.

Um anticorpo ao HER2 que "se liga a um sítio de ligação heterodimérica" de HER2 se liga a resíduos no domínio II (e opcionalmente também se liga a resíduos em outros dos domínios do domínio extracelular de HER2, tais como domínios I e III) e pode impedir estericamente, pelo menos até algum grau, a formação de um heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 ou HER2-HER4. Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328
10 (2004) caracterizaram a estrutura de cristal de HER2-pertuzumab, depositada no RCSB Protein Data Bank (Código de ID IS78), ilustrando um anticorpo exemplificativo que se liga ao sítio de ligação heterodimérica de HER2.
15

Um anticorpo que "se liga ao domínio II" de HER2 se liga a resíduos no domínio II e opcionalmente resíduos em outro(s) domínio(s) de HER2, tais como domínios I e III. De preferência, o anticorpo que se liga ao domínio II se liga à junção entre os domínios I, II e III de HER2.
20

"Expressão" de proteína refere-se à conversão da informação codificada em um gene em RNA mensageiro (mRNA) e, então, à proteína.

Aqui, uma amostra ou célula que "expressa" uma proteína de interesse (tal como um receptor de HER ou ligante de HER) é uma na qual o mRNA que codifica a proteína ou a proteína, incluindo fragmentos da mesma, é determinada como estando presente na amostra ou célula.
25

A técnica de "reação em cadeia de polimerase" ou "PCR", conforme usado aqui, geralmente refere-se a um procedimento em que quantidades diminutas de um pedaço específico de ácido nucleico, RNA e/ou DNA é amplificado, conforme descrito na Pat. U.S. No. 4.683.195 emitida em 28 de Julho de 1987. Geralmente, informação de sequência das extremidades
30

da região de interesse ou além precisa estar disponível, de modo que iniciadores de oligonucleotídeo podem ser projetados; esses iniciadores serão idênticos ou similares, quanto à sequência, às fitas opostas do padrão a ser amplificado. Os nucleotídeos 5' terminais dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. PCR pode ser usada para amplificar sequências de RNA específicas, sequências de DNA específicas a partir de DNA genômico total e cDNA transcrito de RNA celular total, bacteriófago ou sequências de plasmídeo, etc. Veja, de modo geral, Mullis e colaboradores, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Conforme usado aqui, PCR é considerada como sendo um, mas não o único, exemplo de um método de reação de polimerase de ácido nucleico para amplificação de uma amostra de teste de ácido nucleico compreendendo o uso de um ácido nucleico conhecido (DNA ou RNA) como um iniciador e utiliza uma polimerase de ácido nucleico para amplificar ou gerar um pedaço específico de ácido nucleico ou amplificar ou gerar um pedaço específico de ácido nucleico o qual é complementar a um ácido nucleico em particular.

"Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real" ou "qRT-PCR" refere-se a uma forma de PCR em que a quantidade de produto de PCR é medida em cada etapa em uma reação de PCR. Essa técnica foi descrita em várias publicações, incluindo Cronin e colaboradores, *Am. J. Pathol.* 164(1): 35-42 (2004); e Ma e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 607-616 (2004).

O termo "microarranjo" refere-se a uma disposição ordenada de elementos de arranjo passíveis de hibridização, de preferência sondas de polinucleotídeo, sobre um substrato.

O termo "polinucleotídeo", quando usado no singular ou plural, geralmente refere-se a qualquer poliribonucleotídeo ou polideóxiribonucleotídeo, o qual pode ser RNA ou DNA não modificado ou RNA ou DNA modificado. Assim, por exemplo, polinucleotídeos, conforme definido aqui, incluem, sem limitação, DNA fita simples e dupla, DNA incluindo regiões fita simples e dupla, RNA fita simples e dupla e RNA incluindo regiões fita simples e dupla,

moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que pode ser fita simples ou, mais tipicamente, envolvem apenas uma região de algumas das moléculas. Uma das moléculas de uma região com hélice tripla frequentemente é um oligonucleotídeo. O termo "polinucleotídeo" inclui, especificamente, cDNAs. O termo inclui DNAs (incluindo cDNAs) e RNAs que contêm uma ou mais bases modificadas. Assim, DNAs ou RNAs com partes principais modificadas para estabilidade ou outras razões são "polinucleotídeo" conforme esse termo é usado aqui. Além disso, DNAs ou RNAs compreendendo bases incomuns, tal como inosina, ou bases modificadas, tais como bases tritadas, são incluídos dentro do termo "polinucleotídeos" conforme definido aqui. Em geral, o termo "polinucleotídeo" abrange todas as formas química, enzimática e/ou metabolicamente modificadas de polinucleotídeos não modificados, bem como as formas químicas de DNA e RNA característicos de vírus e células, incluindo células simples e complexas.

O termo "oligonucleotídeo" refere-se a um polinucleotídeo relativamente curto incluindo, sem limitação, deóxiribonucleotídeos fita simples, ribonucleotídeos fita simples ou dupla, híbridos de RNA:DNA e DNAs fita dupla. Oligonucleotídeos, tais como oligonucleotídeos de sonda de DNA fita simples, são frequentemente sintetizados através de métodos químicos, por exemplo, usando sintetizadores de oligonucleotídeo automáticos que estão comercialmente disponíveis. Contudo, oligonucleotídeos podem ser feitos através de uma variedade de outros métodos, incluindo técnicas DNA recombinante-mediadas *in vitro* e através de expressão de DNAs em células e organismos.

A frase "amplificação de gene" refere-se a um processo pelo qual múltiplas cópias de um gene ou fragmento de gene são formadas em uma célula ou linhagem de célula em particular. A região duplicada (um trecho de DNA amplificado) é frequentemente referida como "amplicon". Usualmente, a quantidade do RNA mensageiro (mRNA) produzido também aumenta na proporção do número de cópias feitas do gene expresso em particular.

"Estringência" de reações de hibridização é prontamente deter-

- minável por aqueles habilitados na técnica e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas maiores para anelamento apropriado, enquanto que sondas mais curtas precisam de temperaturas menores. Hibridização geralmente depende da capacidade do DNA desnaturado de reanelar quando fitas complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência passível de hibridização, maior a temperatura relativa a qual pode ser usada. Como um resultado, segue que maiores temperaturas relativas tenderão a tornar as condições de reação mais estridentes, enquanto que temperaturas menores não. Para detalhes adicionais e explicação de estridência de reações de hibridização veja Ausubel e colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).
- "Condições estridentes" ou "condições de alta estridência", conforme definido aqui, tipicamente: (1) empregam baixa resistência iônica e alta temperatura de lavagem, por exemplo, cloreto de sódio a 0,015M / citrato de sódio a 0,0015M / dodecil sulfato de sódio a 0,1% a 50°C; (2) empregam, durante hibridização, um agente de desnaturação, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com albumina de soro bovino a 0,1% / Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/tampão de fosfato de sódio a 50 mM em um pH de 6,5 com cloreto de sódio a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, 5X SSC (NaCl a 0,75 M, citrato de sódio a 0,075 M), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, 5x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão submetido a ultra-som (50 µg; g/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrana a 10% a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguido por uma lavagem em alta estridência consistindo de 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C.
- "Condições de estridência moderada" podem ser identificadas conforme descrito por Sambrook e colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluem o uso

de uma solução de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, resistência iônica e % de SDS) menos estridentes do que aquelas descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente estridentes é incubação durante a noite a 37°C em uma solução compreendendo: formamida a 20%, 5 x SSC (NaCl a 150 mM, citrato trissódico a 15 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 7,6), 5x solução de Denhardt, sulfato de dextrana a 10% e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em 1x SSC em torno de 37-50°C. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão como ajustar a temperatura, resistência iônica, etc. conforme necessário para acomodar fatores tal como comprimento da sonda e semelhantes.

Um polipeptídeo de "sequência nativa" é um o qual tem a mesma sequência de aminoácido que um polipeptídeo (por exemplo, receptor de HER ou ligante de HER) derivado da natureza, incluindo variantes alélicas ou que ocorrem naturalmente. Tais polipeptídeos de sequência nativa podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos através de meios recombinantes ou sintéticos. Assim, um polipeptídeo de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácido de um polipeptídeo humano, polipeptídeo de murino ou polipeptídeo de qualquer outra espécie de mamífero que ocorre naturalmente.

O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e abrange especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multi-específicos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpo, na medida em que eles exibam a atividade biológica desejada.

O termo "anticorpo monoclonal", conforme usado aqui, refere-se a um anticorpo de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos e/ou se ligam ao(s) mesmo(s) epítipo(s), exceto quanto a possíveis variantes que podem surgir durante produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades mínimas. Tal anticorpo monoclonal inclui, tipicamente, um anticorpo compreendendo uma se-

quência de polipeptídeo que se liga a um alvo, em que a sequência polipeptídica de ligação ao alvo foi obtida através de um processo que inclui a seleção de uma sequência polipeptídica de ligação a um único alvo de uma pluralidade de sequências polipeptídicas. Por exemplo, o processo de seleção

5 pode ser a seleção de um clone único de uma pluralidade de clones, tal como um reservatório de clones de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinante. Deve ser entendido que a sequência de ligação ao alvo selecionada pode ser ainda alterada, por exemplo, para melhorar a afinidade pelo alvo, para humanizar a sequência de ligação ao alvo, para melhorar sua

10 produção em cultura de células, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para criar um anticorpo multi-específico, etc. e que um anticorpo compreendendo a sequência de ligação ao alvo alterada é também um anticorpo monoclonal da presente invenção. Em contraste a preparados de anticorpo policlonal os quais incluem, tipicamente, diferentes anticorpos dirigidos contra

15 diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de um preparado de anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante sobre um antígeno. Além de sua especificidade, os preparados de anticorpo monoclonal são vantajosos pelo fato de que eles não são, tipicamente, contaminados com outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o

20 caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser construído como requerendo a produção de anticorpo através de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos através de uma variedade de técnicas incluindo,

25 por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo, Kohler e colaboradores, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow e colaboradores, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling e colaboradores em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (veja, por exemplo,

30 Patente U.S. Nº 4.816.567), tecnologias de *phage display* (veja, por exemplo, Clackson e colaboradores, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks e colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Sidhu e colaboradores, *J. Mol.*

Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee e colaboradores, *J. Mol. Biol.* 340, 5: 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee e colaboradores, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004) e tecnologias para a produção de anticorpos humanos ou semelhantes aos humanos em animais que têm partes ou todos os *loci* de imunoglobulina humana ou genes que codificam sequências de imunoglobulina humana (veja, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits e colaboradores, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann e colaboradores, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); Patentes U.S. N°s 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas da GenPharm); Patente U.S. N° 5.545.807; WO 1997/17852; Patentes U.S. N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016; Marks e colaboradores, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg e colaboradores, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild e colaboradores, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol*, 13: 65-93 (1995)).

Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga à sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie em particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo em particular, enquanto que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a ou homólogo à sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo à outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, na medida em que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. N° 4.816.567; e Morrison e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem os anticorpos Aprimatized® compreendendo sequências de ligação a antígeno de domínio variável derivadas de um primata não-humano (por exemplo, antigo mundo dos macaco, Macaco, etc.) e sequências de região constante humana, bem como anticorpos

"humanizados".

Formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, de roedor) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em sua maioria, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais resí-
 5 duos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho ou primata não-humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resí-
 10 duos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anti-
 15 corpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e, tipicamente, dois domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os loops hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também
 20 compreenderá, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região Constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais veja Jones e colaboradores, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann e colaboradores, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

25 Anticorpos ao HER2 humanizados incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 ou trastuzumab (HERCEPTIN®), conforme descrito na Tabela 3 da Patente U.S. 5.821.337, expressamente incorporada aqui por referência; anticorpo 520C9 humanizado (W093/21319); e 2C4 hu-
 30 manizado, tal como pertuzumab, conforme descrito aqui.

Para as finalidades aqui, "trastuzumab," "HERCEPTIN®" e "huMAb4D5-8" referem-se a um anticorpo compreendendo as sequências de

aminoácido de cadeia leve e pesada em SEQ ID N°S 15 and 16, respectivamente.

Diferenças entre as funções do pertuzumab e trastuzumab são ilustradas na figura 6.

5 Um "anticorpo intacto" aqui é um o qual compreende duas regiões de ligação a antígeno e uma região Fc. De preferência, o anticorpo intacto tem uma região Fc funcional.

"Fragmentos de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto, de preferência compreendendo a região de ligação a antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo com cadeia simples; e anticorpos multi-específicos formados de fragmento(s) de anticorpo.

15 "Anticorpos nativos" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 dáltons, compostas de cadeias leve (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação covalente de dissulfeto, enquanto que o número de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem 20 ligações em ponte de dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por uma série de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável (V_L) em uma extremidade e um domínio constante em sua outra extremidade. O domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro 25 domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácido particulares formem uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada.

30 O termo "variável" refere-se ao fato de que determinadas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente, quanto à sequência, dentre anticorpos e são usados na ligação e especificidade de cada anticorpo particular por seu antígeno em particular. Contudo, a variabilidade não

está uniformemente distribuída por todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis nos domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas as regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve nativas compreendem, cada um, quatro FRs, que adotam grandemente uma configuração de β -folha, conectada por três regiões hipervariáveis, as quais formam loops que conectam e, em alguns casos, formam parte da estrutura de β -folha. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade íntima pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis de outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno dos anticorpos (veja Kabat e colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos em ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetadoras, tal como participação do anticorpo em citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC).

O termo "região hipervariável", quando usado aqui, refere-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo os quais são responsáveis pela ligação a antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácido de uma "região de determinação de complementaridade" ou "CDR" (por exemplo, os resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "laço hipervariável" (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia pesada e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Resíduos de "região de estrutura" ou "FR" são aqueles outros resíduos do domínio variável que não os resíduos da região hipervariável, conforme definido aqui.

Digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação a antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação a antígeno e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalizar prontamente. Tratamento com pep-

5 sina proporciona um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de ligação a antígeno e ainda é capaz de ligação cruzada com o antígeno.

"Fv" é o fragmento mínimo de anticorpo o qual contém um sítio de ligação a antígeno e reconhecimento de antígeno completo. Essa região consiste de um dímero de uma cadeia pesada e um domínio variável de ca-

10 deia leve em associação íntima não covalente. É nessa configuração que há três regiões hipervariáveis de cada interação de domínio variável para definir um sítio de ligação a antígeno sobre a superfície do dímero V_H-V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação a antígeno ao anticorpo. Contudo, mesmo um único domínio variável (ou me-

15 tade de um Fv compreendendo apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar a antígeno, embora em uma afinidade menor do que o sítio de ligação todo.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos

20 Fab= diferem de fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos no carbóxi término do domínio CH1 de cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes trazem pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram

25 originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' os quais têm cisteínas na dobradiça dos mesmos. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo também são conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominadas kappa (κ) e lambda (λ), baseado nas sequências de aminoácido de

30 seus domínios constantes.

O termo "região Fc" aqui é usado para definir uma região C-

terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo as regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida como se estendendo de um resíduo de aminoácido na posição Cys266 ou de Pro230 ao carboxi-
5 término do mesmo. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante produção ou purificação do anticorpo ou através de manipulação recombinante do ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Con-
10 sequentemente, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpo com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpo sem resíduos K447 removidos e populações de anticorpo tendo uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447.

A menos que de outro modo indicado, aqui, a numeração dos
15 resíduos em uma cadeia pesada de imunoglobulina é aquela do índice EU conforme em Kabat e colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), expressamente incorporado aqui por referência. O "índice EU conforme em Kabat" refere-se à numeração EU de resíduo do anti-
20 corpo IgG1 humano.

Uma "região Fc funcional" possui uma "função efetuada" de uma região Fc de sequência nativa. "Funções efetuidoras" exemplificativas incluem ligação a C1q; citotoxicidade complemento-dependente; ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente (ADCC);
25 fagocitose; subregulação de receptores na superfície celular (por exemplo, receptor de células B; BCR); etc. Tais funções efetuidoras geralmente requerem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser avaliadas usando vários ensaios, conforme aqui descrito por exemplo.

30 Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma sequência de aminoácido idêntica à sequência de aminoácido de uma região Fc encontrada na natureza. Regiões Fc humanas de sequência nativa incluem

uma região Fc de IgG1 humana de sequência nativa (alotipos não-A e A); região Fc de IgG2 humana de sequência nativa; região Fc de IgG3 humana de sequência nativa; e região Fc de IgG4 humana de sequência nativa, bem como variantes que ocorrem naturalmente das mesmas.

5 Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácido a qual difere daquela de uma região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido, de preferência uma ou mais substituições de aminoácido. De preferência, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com uma região Fc
10 de sequência nativa ou com a região Fc de um polipeptídeo precursor, por exemplo, de cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácido e, de preferência, de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácido em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo precursor. A região Fc variante aqui possuirá, de preferência, pelo menos cerca
15 de 80% de homologia com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo precursor e, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 90% de homologia com a mesma, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de homologia com a mesma.

Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante
20 de suas cadeias pesadas, anticorpos intactos podem ser atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e várias dessas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes
25 de anticorpos são denominados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

"Citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente" e "ADCC" referem-se a uma reação célula-mediada na qual células citotóxicas específicas
30 que expressam receptores de Fc (FcRs) (por exemplo, células Assassinas Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado sobre uma célula alvo e subsequentemente causam lise da célula alvo.

As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam FcγRIII apenas, enquanto que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991).

5 Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como aquele descrito na Patente US Nº 5.500.362 ou 5.821.337 pode ser realizado. Células efetadoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, atividade de ADCC

10 da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal, tal como aquele descrito em Clynes e colaboradores, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

"Células efetadoras humanas" são leucócitos os quais expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efetadoras. De preferência, as células expressam pelo menos FcγRIII e desempenham função efetadora ADCC. Exemplos de leucócitos humanos os quais mediam a ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células NK sendo preferidas. As células efetadoras podem ser

15 isoladas de uma fonte nativa das mesmas, por exemplo, de sangue ou PBMCs, conforme descrito aqui.

20

Os termos "receptor de Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR é um o qual se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas com *splicing* desses receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), os quais têm sequências de aminoácido similares que diferem primariamente quanto

25 aos domínios citoplásmicos dos mesmos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação baseado em tirosina de imuno-receptor (I-TAM) em seu domínio citoplásmico. O receptor de inibição FcγRIIB contém

30

um motivo de inibição baseado em tirosina de imuno-receptor (ITEM) em seu domínio citoplásmico (veja revisão em M. Daeron, *Anna. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcRs são revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel e colaboradores, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas e colaboradores, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são abrangidos pelo termo "FcR" aqui. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, o qual é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer e colaboradores, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim e colaboradores, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) e regula a homeostase de imunoglobulinas.

"Citotoxicidade complemento-dependente" ou "CDC" refere-se à capacidade de uma molécula de submeter à lise um alvo na presença de complemento. A via de ativação de complemento é iniciada através da ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) em complexo com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação de complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, conforme descrito em Gazzano-Santoro e colaboradores, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996), pode ser realizado.

Fragmentos de anticorpo "Fv com cadeia simples" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma cadeia polipeptídica única. De preferência, o polipeptídeo de Fv ainda compreende um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L o qual permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de scFv veja Plickthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994). Fragmentos de anticorpo scFv são descritos no W093/16185; Patente U.S. Nº 5.571.894; e Patente U.S. Nº 5.587.458.

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação a antígeno, fragmentos os quais compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio

variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica ($V_H - V_L$). Usando um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígeno. Diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, na patente EP 404,097; WO 93/11161; e Hollinger e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Um "anticorpo naked" é um anticorpo que não está conjugado a uma molécula heteróloga, tal como uma porção citotóxica ou rádio-rótulo.

Um anticorpo "isolado" é um o qual tenha sido identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais os quais podem interferir com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado (1) em mais de 95% em peso do anticorpo, conforme determinado através do método de Lowry e, mais preferivelmente, mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido interno ou N-terminal através do uso de um sequenciador com copo de centrifuga ou (3) até homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul Coomassie ou, de preferência, coloração de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não está presente. Comumente, contudo, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

Um anticorpo "maturado por afinidade" é um com uma ou mais alterações em uma ou mais regiões hipervariáveis do mesmo, as quais resultam em aperfeiçoamento na afinidade do anticorpo por um antígeno, comparado com um anticorpo precursor o qual não possui essa(s) alteração(ões). Anticorpos maturados por afinidade preferidos têm afinidades em nanomolar ou mesmo picomolar pelo antígeno alvo. Anticorpos maturados por afinidade são produzidos através de procedimentos conhecidos na técnica

ca. Marks e colaboradores, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) descrevem a maturação por afinidade através de embaralhamento de domínios VH e VL. Mutagênese aleatória de CDR e/ou resíduos de estrutura é descrita por Barbas e colaboradores, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier e colaboradores, *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton e colaboradores, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson e colaboradores, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); e Hawkins e colaboradores, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

O termo "anticorpo de espécie principal" aqui refere-se à estrutura de anticorpo em uma composição a qual é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição. Em uma modalidade, o anticorpo de espécie principal é um anticorpo a HER2, tal como um anticorpo que se liga ao Domínio II de HER2, um anticorpo que inibe a dimerização de HER mais eficazmente do que o trastuzumab e/ou um anticorpo o qual se liga ao sítio de ligação heterodimérica e sequências de aminoácido de cadeia pesada variável em SEQ ID N°s 3 e 4 e, mais preferivelmente, compreendendo as sequências de aminoácido de cadeia pesada e de cadeia leve em SEQ ID N°s 13 e 14 (pertuzumab).

Um anticorpo com "sequência de aminoácido variante" aqui é um anticorpo com uma sequência de aminoácido a qual difere de um anticorpo de espécie principal. Comumente, variantes de sequência de aminoácido possuirão pelo menos cerca de 70% de homologia com o anticorpo de espécie principal e, de preferência, eles serão pelo menos cerca de 80%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% homólogos com o anticorpo de espécie principal. As variantes de sequência de aminoácido possuem substituições, deleções e/ou adições em determinadas posições dentro ou adjacentes à sequência de aminoácido do anticorpo de espécie de anticorpo. Exemplos de variantes de sequência de aminoácido aqui incluem uma variante ácida (por exemplo, variante de anticorpo deamidada), uma variante básica, um anticorpo com uma extensão líder amino-terminal (por exemplo, VHS-) sobre uma ou duas cadeias leves do mesmo, um anticorpo com um resíduo de lisina C-terminal sobre uma ou duas cadeias pesadas do mesmo,

etc. e inclui combinações de variações nas sequências de aminoácido de cadeias pesada e/ou leve. A variante de anticorpo de interesse particular aqui é o anticorpo compreendendo uma extensão líder amino-terminal sobre uma ou duas cadeias leves do mesmo, opcionalmente ainda compreendendo outra sequência de aminoácido e/ou diferenças de glicosilação com relação ao anticorpo de espécie principal.

Um anticorpo com "variante de glicosilação" aqui é um anticorpo com uma ou mais porções de carboidrato presas ao mesmo as quais diferem de uma ou mais porções de carboidrato presas a um anticorpo de espécie principal. Exemplos de variantes de glicosilação aqui incluem um anticorpo com uma estrutura de oligossacarídeo G1 ou G2, ao invés de uma estrutura de oligossacarídeo G0, presa a uma região Fc do mesmo, um anticorpo com uma ou duas porções de carboidrato presas a uma ou duas cadeias leves do mesmo, um anticorpo sem carboidrato preso a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, etc. e combinações de alterações de glicosilação.

Onde o anticorpo tem uma região Fc, uma estrutura de oligossacarídeo pode ser presa a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, por exemplo, no resíduo 299 (298, numeração EU de resíduos). Para o pertuzumab, G0 era a estrutura de oligossacarídeo predominante, com outras estruturas de oligossacarídeo, tais como G0-F, G-1, ManS, Mand, G-1, G1(1-6), G1(1-3) e G2, sendo encontradas em quantidades menores na composição do pertuzumab.

A menos que de outro modo indicado, uma estrutura de oligossacarídeo AG1 aqui inclui estruturas G-1, G1-1, G1(1-6) e G1(1-3).

Uma "extensão líder amino-terminal" aqui refere-se a um ou mais resíduos de aminoácido da sequência líder amino-terminal que estão presentes no amino-término de qualquer uma ou mais cadeias pesadas ou leves de um anticorpo. Uma extensão líder amino-terminal exemplificativa compreende ou consiste de três resíduos de aminoácido, VHS, presentes sobre uma ou ambas as cadeias leves de uma variante de anticorpo.

Um anticorpo "deamidado" é um no qual um ou mais resíduos de asparagina do mesmo foram derivatizados, por exemplo, a um ácido aspárti-

co, uma succinimida ou um ácido iso-aspartico.

Os termos "câncer" e "cânceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é, tipicamente, caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas não são limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluindo meduloblastoma e retinoblastoma), sarcoma (incluindo liposarcoma e sarcoma de células sinoviais), tumores neuroendócrinos (incluindo tumores carcinóides, gastrinoma e câncer de células da ilhota), mesotelioma, schwannoma (incluindo neuro-
ma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem
câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células escamosas epiteliais), câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago, incluindo câncer gastrintestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama (incluindo câncer de mama metastático), câncer de cólon, câncer retal, câncer cólon-retal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma da glândula salivar, câncer de rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer da
tíróide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pênis, câncer testicular, câncer esofageal, tumores do trato biliar, bem como câncer de cabeça e pescoço.

Um câncer "avançado" é um o qual disseminou para fora do local ou órgão de origem, quer através de invasão local ou metástase.

Um câncer "resistente" é um o qual progride mesmo embora um agente anti-tumor, tal como um agente quimioterapêutico, está sendo administrado ao paciente com câncer. Um exemplo de um câncer resistente é um o qual é resistente à platina.

Um câncer "recorrente" é um o qual crescer novamente, no local inicial ou em um local distante, após uma resposta à terapia inicial.

Aqui, um "paciente" é um paciente humano. O paciente pode ser

um paciente com câncer, isto é, um que está sofrendo ou em risco de sofrer de um ou mais sintomas de câncer.

Uma "amostra de tumor" aqui é uma amostra derivada de ou compreendendo células tumorígenas do tumor de um paciente. Exemplos de amostras de tumor aqui incluem, mas não estão limitados a, biópsias de tumor, células tumorígenas em circulação, proteínas em circulação no plasma, fluido ascítico, culturas de células primárias ou linhagens de células derivadas de tumores ou exibindo propriedades semelhante a tumor, bem como amostras de tumor preservadas, tais como amostras de tumor fixadas em formalina, incrustadas em parafina ou amostras de tumor congeladas.

Uma amostra de tumor "fixada" é uma a qual tenha sido histologicamente preservada usando um fixador.

Uma amostra de tumor "fixada em formalina" é uma a qual tenha sido preservada usando formaldeído como o fixador.

Uma amostra de tumor "incrustada" é uma envolvida por um meio firme e geralmente duro, tal como parafina, cera, celoidina ou uma resina. Incrustação torna possível o corte de seções finas para exame microscópico ou para a geração de microarranjos teciduais (TMAs).

Uma amostra de tumor "incrustada em parafina" refere-se a uma amostra de tumor a qual é envolvida por uma mistura purificada de hidrocarbonetos sólidos derivados de petróleo.

Aqui, uma amostra de tumor "congelada" refere-se a uma amostra de tumor a qual é ou tenha sido congelada.

Uma amostra de câncer ou biológica a qual "mostra expressão, amplificação ou ativação de HER" é uma a qual, em um teste diagnóstico, expressa (incluindo superexpressa) um receptor de HER, tem um gene de HER amplificado e/ou de outro modo demonstra ativação ou fosforilação de um receptor de HER.

Uma amostra de câncer ou biológica a qual "mostra ativação de HER" é uma a qual, em um teste diagnóstico, demonstra ativação ou fosforilação de um receptor de HER. Tal ativação pode ser determinada diretamente (por exemplo, através de medição de fosforilação de HER através de ELI-

SA) ou indiretamente (por exemplo, através de caracterização de perfil de expressão ou através de detecção de heterodímeros de HER, conforme descrito aqui).

5 Aqui, "caracterização de perfil de expressão de gene" refere-se a uma avaliação de expressão de um ou mais genes como um substituto para determinação de fosforilação de HER diretamente.

10 Um "ensaio fosfo-ELISA" aqui é um ensaio no qual fosforilação de um ou mais receptores de HER, especialmente HER2, é avaliada em um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) usando um reagente, usualmente um anticorpo, para detectar o receptor HER fosforilado, substrato ou molécula de sinalização a jusante. De preferência, um anticorpo o qual detecta HER2 fosforilado é usado. O ensaio pode ser realizado sobre lisatos de célula, de preferência de amostras biológicas frescas ou congeladas.

15 Uma célula cancerígena com "amplificação ou superexpressão do receptor de HER" é uma a qual tem níveis significativamente maiores de uma proteína ou gene do receptor de HER comparado com uma célula não cancerígena do mesmo tipo de tecido. Tal superexpressão pode ser causada por amplificação de gene ou através de transcrição ou tradução aumentada. Superexpressão ou amplificação do receptor de HER pode ser determinada
20 em um ensaio diagnóstico ou prognóstico através de avaliação dos níveis aumentados da proteína de HER presente sobre a superfície de uma célula (por exemplo, via um ensaio de imunohistoquímica; IHC). Alternativa ou adicionalmente, se pode medir os níveis de ácido nucleico que codifica HER na célula, por exemplo, via hibridização fluorescente *in situ* (FTSH; veja
25 W098/45479 publicado em Outubro de 1998), Southern blotting ou técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), tal como PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Também se pode estar a superexpressão ou amplificação do receptor de HER através de medição do antígeno de proteção (por exemplo, domínio extracelular de HER) em um fluido biológico, tal como soro
30 (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.933.294 emitida em 12 de Junho de 1990; WO91/05264 publicado em 18 de Abril de 1991; Patente U.S. 5.401.638 emitida em 28 de Março de 1995; e Sias e colaboradores, *J. Im-*

munol. Methods 132: 73-80 (1990)). Além dos ensaios acima, vários ensaios *in vivo* estão disponíveis para o praticante habilitado. Por exemplo, se pode expor as células dentro do corpo do paciente a um anticorpo o qual é opcionalmente rotulado com um rótulo detectável, por exemplo, um isótopo radioativo, e a ligação do anticorpo às células no paciente pode ser avaliada, por exemplo, através de exploração externa pela radioatividade ou através de análise de uma biópsia tomada de um paciente previamente exposto ao anticorpo.

Inversamente, um câncer o qual "não superexpressa ou amplifica o receptor de HER" é um o qual não tem níveis maiores do que o normal de proteína ou gene do receptor de HER comparado com uma célula não cancerígena do mesmo tipo de tecido. Anticorpos que inibem a dimerização de HER, tal como pertuzumab, podem ser usados para tratar câncer o qual não superexpressa ou amplifica o receptor de HER2.

Aqui, um "agente anti-tumor" refere-se a um fármaco usado para tratar câncer. Exemplos não limitativos de agentes anti-tumor aqui incluem agentes quimioterapêuticos, inibidores de dimerização de HER, anticorpos ao HER, anticorpos dirigidos contra antígenos tumor-associados, compostos anti-hormonais, citocinas, fármacos EGFR-objetivados, agentes citotóxicos, anticorpos que induzem à apoptose, inibidores de COX, inibidores de farnesil transferase, anticorpos que se ligam à proteína oncofetal CA 125, vacinas de HER2, inibidores de Raf ou Rãs, doxorubicina lipossômica, topotecan, taxano, inibidores duplos de quinase de tirosina, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib e bevacizumab.

Um "agente anti-tumor aprovado" é um fármaco usado para tratar câncer o qual tenha tido aprovação para comercialização por uma autoridade regulatória, tal como a administração da comida e fármaco (FDA) ou equivalente estrangeiro da mesma.

Onde um inibidor de dimerização de HER é administrado como um "único agente anti-tumor", ele é o único agente anti-tumor administrado para tratar o câncer, isto é, ele não é administrado em combinação com outro agente anti-tumor, tal como quimioterapia.

Por "padrão de cuidados" aqui entenda-se o agente ou agentes anti-tumor os quais são rotineiramente usados para tratar uma forma de câncer em particular. Por exemplo, para câncer ovariano resistente à platina, o padrão de cuidados é topotecan ou doxorubicina lipossômica.

5 Um "agente inibitório de crescimento", quando usado aqui, refere-se a um composto ou composição a qual inibe o crescimento de uma célula, especialmente uma célula câncerígena expressando HER, quer *in vitro* ou *in vivo*. Assim, o agente inibitório pode ser um o qual reduz significativamente o percentual de células expressando HER na fase S. Exemplos de
10 agentes inibitórios de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (em uma outra que não a fase S), tais como agentes que induzem à interrupção de G1 e interrupção da fase M. Bloqueadores de fase M clássicos incluem os vinca (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores de topo II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposídeo e bleomicina. Aqueles agentes que interrompem G1 também atuam
15 sobre a interrupção da fase S, por exemplo, agentes de alquilação de DNA, tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracila e ara-C. Informação adicional pode ser encontrada em *The Molecular Basis of Câncer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs"
20 por Murakami e colaboradores (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente página 13.

Exemplos de anticorpos "inibitórios de crescimento" são aqueles os quais se ligam ao HER2 e inibem o crescimento de células câncerígenas
25 superexpressando HER2. Anticorpos ao HER2 inibitórios de crescimento preferidos inibem o crescimento de SK-BR-3 em mais de 50% (por exemplo, de cerca de 50% a cerca de 100%) em uma concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml, onde a inibição de crescimento é determinada seis dias após exposição das células SK-BR-3 ao anticorpo (veja Patente U.S. Nº
30 5.677.171 emitida em 14 de Outubro de 1997). O ensaio de inibição de crescimento de células SK-BR-3 é descrito em maiores detalhes nessa patente e aqui abaixo. O anticorpo inibitório de crescimento preferido é uma variante

humanizada do anticorpo monoclonal de murino 4D5, por exemplo, trastuzumab.

Um anticorpo o qual "induz à apoptose" é um o qual induz à morte celular programada, conforme determinado através de ligação de anexina V, fragmentação de DNA, retração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de vesículas na membrana (denominados corpos apoptóticos). A célula usualmente é uma a qual superexpressa o receptor HER2. De preferência, a célula é uma célula tumorigena, por exemplo, uma célula de mama, ovariana, estômago, endometrial, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireóide, pancreática ou bexiga. *In vitro*, a célula pode ser uma célula SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou SKOV3. Vários métodos estão disponíveis para avaliação dos eventos celulares associados à apoptose. Por exemplo, translocação de fosfatidil serina (PS) pode ser medida através de ligação à anexina; fragmentação de DNA pode ser avaliada através de laddering de DNA; e condensação nuclear/cromatina junto com fragmentação de DNA pode ser avaliada através de qualquer aumento em células hipodiplóides. De preferência, o anticorpo o qual induz à apoptose é um o qual resulta em uma indução de cerca de 2 a 50 vezes, de preferência cerca de 5 a 50 vezes e, mais preferivelmente, cerca de 10 a 50 vezes da ligação à anexina com relação a uma célula não tratada em um ensaio de ligação à anexina usando células BT474 (veja abaixo). Exemplos de anticorpos ao HER2 que induzem à apoptose são 7C2 e 7F2.

O "epítipo 2C4" é a região no domínio extracelular de HER2 à qual o anticorpo 2C4 se liga. De forma a selecionar anticorpos os quais se ligam ao epítipo 2C4, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina, tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser realizado. De preferência, o anticorpo bloqueia a ligação de 2C4 ao HER2 em cerca de 50% ou mais. Alternativamente, mapeamento de epítipo pode ser realizado para avaliar se o anticorpo se liga ao epítipo 2C4 de HER2. O epítipo 2C4 compreende resíduos do Domínio II no domínio extracelular de HER2. 2C4 e

pertuzumab se ligam ao domínio extracelular de HER2 na junção dos domínios I, II e III. Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328 (2004).

O "epítopo 4D5" é a região no domínio extracelular do HER2 à qual o anticorpo 4D5 (ATCC CRL 10463) e trastuzumab se ligam. Esse epítopo está próximo do domínio transmembrana do HER2 e dentro do Domínio IV de HER2. Para selecionar anticorpos os quais se ligam ao epítopo 4D5, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina, tal como aquele descritos em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser realizado. Alternativamente, mapeamento de epítopo pode ser realizado para avaliar se o anticorpo se liga ao epítopo 4D5 do HER2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região de cerca do resíduo 529 a cerca do resíduo 625, inclusive, da ECD de HER2, a numeração de resíduo incluindo o peptídeo sinalizador).

O "epítopo 7C2/7F3" está na região no N-término, dentro do Domínio I, do domínio extracelular de HER2 à qual os anticorpos 7C2 e/ou 7F3 (cada um depositado na ATCC, veja abaixo) se ligam. Para selecionar anticorpos os quais se ligam ao epítopo 7C2/7F3, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina, tal como aquele descritos em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser realizado. Alternativamente, mapeamento de epítopo pode ser realizado para estabelecer se o anticorpo se liga ao epítopo 7C2/7F3 do HER2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região de cerca do resíduo 22 a cerca do resíduo 53 da ECD do HER2, a numeração de resíduo incluindo o peptídeo sinalizador).

"Tratamento" refere-se a tratamento terapêutico e profilático ou medidas preventivas. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles que já estão com câncer, bem como aqueles nos quais câncer tem de ser prevenido. Consequentemente, o paciente a ser tratado aqui pode ter sido diagnosticado como tendo câncer ou pode estar predisposto ou suscetível a câncer.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar câncer no paciente. A quanti-

dade eficaz do fármaco pode reduzir o número de células câncerígenas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, diminuir até algum ponto e, de preferência, parar) a infiltração de células câncerígenas em órgãos periféricos; inibir (isto é, diminuir até algum ponto e, de preferência, parar) a metástase de tumor; inibir, até algum ponto, o crescimento de tumor; e/ou aliviar, até algum ponto, um ou mais dos sintomas associados ao câncer. Até o ponto em que o fármaco pode prevenir o crescimento e/ou matar células câncerígenas existentes, ele pode ser citostático e/ou citotóxico. A quantidade eficaz pode prolongar a sobrevivência isenta de progressão (por exemplo, conforme medido através do Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST, ou alterações em CA-125), resulta em uma resposta objetiva (incluindo uma resposta parcial, PR ou resposta completa, CR), aumenta o tempo global de sobrevivência e/ou melhora um ou mais sintomas de câncer (por exemplo, conforme avaliado através de FOSI).

O termo "agente citotóxico", conforme usado aqui, refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa destruição de células. O termo se destina a incluir isótopos radioativos (por exemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{86} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterapêuticos e toxinas, tais como toxinas de pequena molécula ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes das mesmas.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes de alquilação, tais como tiotepa e ciclofosfamida CYTOXAN; alquil sulfonatos, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietileno tiofosforamida e trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA®); acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina,

escopolectina e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposídeo; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melphalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosuréias, tais como

5 carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; bisfosfonatos, tal como clodronato; antibióticos, tais como os antibióticos de enodiína (por exemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamall e calicheamicina omegall (veja, por exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)) e antraciclinas, tais como anamicina, AD 32, alcarubicina,

10 na, daunorubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogaril, dinemicina, incluindo dinemicina A, uma esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos antibióticos de enodiína relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas,

15 dactinomicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRI-AMYCIN® (incluindo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina lipossômica e deóxido-doxorubicina), esorubicina, marcelomicina, mitomicinas, tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina,

20 quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina e zorubicina; análogos de ácido fólico, tais como denopte-rina, pteropterina e rimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina e tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideóxiuridina,

25 doxifluridina, enocitabina e floxuridina; androgênios, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano e testolactona; anti-adrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano e trilostano; repositores de

30

ácido fólico, tal como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes anti-neoplásicos anti-folato, tais como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inibidores de reductase de dihidrofolato, tal como metotrexato, anti-metabólitos, tal como 5-fluorouracila (5-FU) e seus pró-fármacos, tais como UFT, S-1 e capecitabina e inibidores de sintase de timidilato e inibidores de formiltransferase de ribonucleotídeo de glicinamida, tal como raltitrexed (TOMUDEX®, TDX); inibidores de dehidrogenase de dihidropirimidina, tal como eniluracila; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidróxiuréia; lentinan; lonidainina; maytansinóides, tais como maytansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complexo de polissacarídeo PSK7 (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISPNE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides e taxanos, por exemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE Cremophor-free, formulação em nanopartícula albumina-manipulada de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) e docetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França); cloranbucil; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platina; análogos de platina ou análogos baseados em platina, tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN®); etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); vinca alcalóide; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides, tal como ácido retinóico; sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer um dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima, tal como CHOP, uma abreviação para terapia com-

binada com ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN®) combinada com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nessa definição estão agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação de hormônios sobre tumores, tais como anti-estrogênios e moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidróxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno FARESTON®; inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, a qual regula a produção de estrogênio nas glândulas adrenais tais como, por exemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozola, vorozola RIVISOR®, letrozola FEMARA® e anastrozola ARIMIDEX®; e anti-androgênios, tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; bem como troxacitabina (um análogo de citosina de nucleosídeo de 1,3-dioxolano); oligonucleotídeos anti-senso, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicadas em proliferação celular anormal tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas, tais como vacinas para terapia genética, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECT1M® e vacina VAXID®; rIL-2PROLEUKIN®; inibidor de topoisomerase 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer um dos acima.

Um "agente quimioterapêutico anti-metabólito" é um agente o qual é estruturalmente similar a um metabólito, mas não pode ser usado pelo corpo de uma maneira produtiva. Muitos agentes quimioterapêuticos anti-metabólito interferem com a produção de ácidos nucleicos, RNA e DNA. Exemplos de agentes quimioterapêuticos anti-metabólito incluem gemcitabina (GEMZAR®), 5-fluorouracila (5-FU), capecitabina (XELODA®), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, deóxicitosina, piridmideno, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-

deóxi-D-glicose, etc. O agente quimioterapêutico anti-metabólito preferido é gemcitabina.

5 "Gemcitabina" ou "monohidrocloreto de 2'-deóxi-2', 2'-difluorocitidina (b-isômero)" é um análogo de nucleosídeo que exibe atividade antitumor. A fórmula empírica para HCl de gemcitabina é C₉H₁₁F₂N₃O₄ A HCl. HCl de gemcitabina é vendido pela Eli Lilly sob a marca comercial GEMZAR®.

10 Um "agente quimioterapêutico baseado em platina" compreende um composto orgânico o qual contém platina como uma parte integral da molécula. Exemplos de agentes quimioterapêuticos baseados em platina incluem carboplatina, cisplatina e oxaliplatina.

Por "quimioterapia baseada em platina" entenda-se terapia com um ou mais agentes quimioterapêuticos baseados em platina, opcionalmente em combinação com um ou mais de outros agentes quimioterapêuticos.

15 Por câncer "resistente à quimioterapia" entenda-se que o paciente com câncer progrediu enquanto estava recebendo um regime de quimioterapia (isto é, o paciente é "resistente à quimioterapia") ou o paciente progrediu dentro de 12 meses (por exemplo, dentro de 6 meses) após terminar um regime de quimioterapia.

20 Por "câncer resistente à platina" entenda-se que o paciente com câncer progrediu enquanto estava recebendo quimioterapia baseada em platina (isto é, o paciente é "resistente à platina") ou o paciente progrediu dentro de 12 meses (por exemplo, dentro de 6 meses) após terminar um regime de quimioterapia baseado em platina.

25 Um "agente anti-angiogênico" se a um composto o qual bloqueia ou interfere, até algum grau, com o desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator anti-angiogênico pode, por exemplo, ser uma pequena molécula ou anticorpo que se liga a um fator de crescimento ou receptor de fator de crescimento envolvido na promoção de angiogênese. O fator anti-angiogênico preferido aqui é um anticorpo que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN®).

30

O termo "citocina" é um termo genérico para proteínas liberadas

por uma população de células a qual atua sobre células, tais como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas e hormônios polipeptídicos tradicionais. Incluídos dentre as citocinas estão hormônio do crescimento, tal como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano de N-metionila e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratireóide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormônios de glicoproteína, tal como hormônio de estimulação folicular (FSH), hormônio de estimulação da tireóide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogênio placentar; fator- α e - β de necrose de tumor; substância de inibição muleriana; peptídeo gonadotropina de camundongo-associado; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervo, tal como NGF- β ; fator de crescimento de plaqueta; fatores de crescimento de transformação (TGFs), tais como TGF- α e TGF- β ; fator-I e -II de crescimento semelhante à insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteo-indutivos; interferons, tais como interferon- α , - β e - γ ; fatores de estimulação de colônia (CSFs), tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs), tais como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; um fator de necrose de tumor, tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores polipeptídicos, incluindo LIF e ligante kit (KL). Conforme usado aqui, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de célula recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

Conforme usado aqui, o termo "fármaco EGFR-objetivado" refere-se a um agente terapêutico que se liga ao EGFR e, opcionalmente, inibe a ativação de EGFR. Exemplos de tais agentes incluem anticorpos e pequenas moléculas que se ligam ao EGFR. Exemplos de anticorpos os quais se ligam ao EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (veja Patente US Nº 4.943.533, Mendelsohn e colaboradores) e variantes dos mesmos, tal como 225 quimerizado (C225 ou Cetuximab; ERBUTIX®) e

225 humano re-formatado (H225) (veja WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, um anticorpo EGFR-objetivado totalmente humano (Imclone); anticorpos que se ligam ao EGFR mutante do tipo II (Patente US Nº 5.212.290); anticorpos humanizados e quiméricos que se ligam ao EGFR, conforme descrito na Patente US Nº 5.891.996; e anticorpos humanos que se ligam ao EGFR, tais como ABX-EGF (veja WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto e colaboradores, *Eur. J. Câncer* 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), um anticorpo ao EGFR humanizado dirigido contra o EGFR que compete com o EGF e TGF-alfa pela ligação ao EGFR; e mAb 806 ou mAb 806 humanizado (Johns e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 279(29): 30375-30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente citotóxico, assim, gerando um imunoconjugado (veja, por exemplo, EP659,439A2, Patente da Merck GmbH). Exemplos de pequenas moléculas que se ligam ao EGFR incluem ZD1839 ou Gefitinib (IRESSA; Astra Zeneca); CP-358774 ou Eriotinib (TARCEVA®; Genentech/OSI); e AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

Um "inibidor de quinase de tirosina" é uma molécula a qual inibe a atividade de quinase de tirosina de uma quinase de tirosina, tal como um receptor HER. Exemplos de tais inibidores incluem os fármacos EGFR-objetivados mencionados no parágrafo precedente; inibidor de quinase de tirosina de HER2 de pequena molécula, tal como TAK165 disponível da Takeda; CP-724,714, um inibidor seletivo oral da quinase de tirosina do receptor ErbB2 (Pfizer and OSI); inibidores duplos de HER, tal como EKB-569 (disponível da Wyeth) o qual, de preferência, se liga ao EGFR mas inibe células superexpressando HER2 e EGFR; GW572016 (disponível da Glaxo), um inibidor oral de quinase de tirosina de HER2 e EGFR; PKI-166 (disponível da Novartis); inibidores de pan-HER, tal como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inibidores de Raf-1, tal como o agente anti-senso ISIS-5132 disponível da ISIS Pharmaceuticals, o qual inibe a sinalização à Raf-1; inibidores de TK não objetivados ao HER, tal como mesilato de Imatinib (Gleevac®) disponível da Glaxo; inibidor de quinase I extracelular-regulada MAPK CI-1040 (disponível da Pharmacia); quinazolininas, tal como PD 153035,4-(3-cloroani-

lino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo 2,3-d pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas contendo porções de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas anti-senso (por exemplo, aquelas que se ligam ao ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente US Nº 5.804.396); trifostinas (Patente US Nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inibidores de pan-HER, tais como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevec; Novartis); PKI166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); ou conforme descrito em qualquer uma das seguintes publicações de patente: Patente US Nº 5.804.396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); W097/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); W096/33978 (Zeneca); W096/3397 (Zeneca); e WO96/33980 (Zeneca).

Uma dose "fixa" ou "plana" de um agente terapêutico aqui refere-se a uma dose que é administrada a um paciente humano sem considerar o peso (WT) ou área de superfície corporal (BSA) do paciente. A dose fixa ou plana, portanto, não é fornecida como uma dose em mg/kg ou uma dose em mg/m², mas antes como uma quantidade absoluta do agente terapêutico.

Uma dose de "carregamento" aqui geralmente compreende uma dose inicial de um agente terapêutico administrada a um paciente e é seguida por uma ou mais doses de manutenção da mesma. Geralmente, uma única dose de carregamento é administrada, mas múltiplas doses de carregamento são consideradas aqui. Usualmente, a quantidade de dose(s) de carregamento administrada excede a quantidade da(s) dose(s) de manutenção administrada(s) e/ou a(s) dose(s) de carregamento é(são) administrada(s) mais frequentemente do que a(s) dose(s) de manutenção, de modo a obter a concentração em estado uniforme desejada do agente terapêutico mais cedo do que pode ser obtido com a(s) dose(s) de manutenção.

Uma dose de "manutenção" aqui refere-se a uma ou mais doses de um agente terapêutico administradas ao paciente durante um período de tratamento. Usualmente, as doses de manutenção são administradas em intervalos de tratamento espaçados, tal como aproximadamente a cada se-
 5 mana, aproximadamente a cada 2 semanas, aproximadamente a cada 3 semanas ou aproximadamente a cada 4 semanas.

II. Produção de anticorpo

Uma vez que, na modalidade preferida, o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo, segue uma descrição de técnicas exemplificativas
 10 para a produção de anticorpos ao HER usados de acordo com a presente invenção. O antígeno HER a ser usado para a produção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do domínio extracelular de um receptor HER ou uma porção do mesmo, contendo o epítipo desejado. Alternativa-
 15 mente, células expressando HER em sua superfície celular (por exemplo, células NIH-3T3 transformadas para superexpressar HER2; ou uma linha-
 gem de células de carcinoma, tal como células SK-BR-3, veja Stancovski e colaboradores, *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991)), pode ser usada para gerar anticorpos. Outras formas do receptor HER úteis para geração de anti-
 corpos serão evidentes para aqueles habilitados na técnica.

20 (i) Anticorpos policlonais

Anticorpos policlonais são, de preferência, estimulados em ani-
 mais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip)
 do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno re-
 levante a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por
 25 exemplo, hemocianina do caramujo *Megathura crenulata*, albumina do soro,
 tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifun-
 cional ou de derivatização, por exemplo, maleimidobenzoil sulfo-succinimida
 éster (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidróxi-succinimida
 (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou
 30 $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R' são diferentes grupos alquila.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imu-
 nogênicos ou derivados através de combinação, por exemplo, 100 μg ou 5

µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução intradermicamente em múltiplos locais. Um mês depois, os animais recebem um reforço com 1/5 a 1/10 da quantidade original do peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund através de injeção subcutânea em múltiplos locais. Sete a 14 dias depois, o sangue dos animais é coletado e o soro é ensaiado com relação à titulação de anticorpo. Os animais recebem o reforço até que a titulação nivele. De preferência, o animal recebe um reforço com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um reagente de ligação cruzada diferente. Conjugados também podem ser feitos em cultura de célula recombinante como fusões de proteína. Também, agentes de agregação, tal como alume, são adequadamente usados para intensificar a resposta imune.

(ii) Anticorpos monoclonais

Vários métodos para fazer anticorpos monoclonais aqui estão disponíveis na técnica. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser feitos usando o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e colaboradores, *Nature*, 256: 495 (1975), através de métodos de DNA recombinante (Patente U.S. Nº 4.816.567).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado conforme aqui antes descrito para estimular linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são, então, fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são cultivadas e crescidas em um meio de cultura adequado que contém, de preferência, uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma precursoras não fundidas. Por exemplo, se as células de

mieloma precursoras carecem da enzima fosforibosil transferase de guanina de hipoxantina (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá, tipicamente, hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias as quais impedem o crê de células HGPRT-deficientes.

5 Células de mieloma preferidas são aquelas as quais se fundem eficientemente, sustentam produção estável em alto nível de anticorpo pelas células que produzem anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Dentre essas, linhagens de células de mieloma preferidas são linhagens de mieloma de murino, tais como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis do Salk Institute Cell
10 Distribution Center, San Diego, Califórnia EUA e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Linhagens de célula de heteromieloma de camundongo-humano e mieloma humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur e colaboradores, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

O meio de cultura no qual células de hibridoma estão crescendo é avaliado com relação à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radio imunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através de análise de Scatchard de Munson e colaboradores, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após serem identificadas células de hibridoma que produzem os anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados através de procedimentos de diluição limitativa e crescidos através de métodos padrões (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de
30 cultura adequados para essa finalidade incluem, por exemplo, meio D-MEM

ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vitro* como tumores de ascite em um animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são, adequadamente, separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro através de procedimentos convencionais de purificação de anticorpo tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidróxiapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

DNA que codifica os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos de murino). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão os quais são, então, transfectados em células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de Ovário de Hâms-ter Chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem, de outro modo, proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codifica o anticorpo incluem Skerra e colaboradores, *Curr. Opin. in Immunol*, 5: 256-262 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188(1992).

Em uma outra modalidade, anticorpos monoclonais ou fragmento de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo geradas usando as técnicas descritas em McCafferty e colaboradores, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson e colaboradores, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks e colaboradores, *J. Mol. Biol*, 222: 581-597 (1991) descrevem a produção de anticorpos humanos com alta afinidade (faixa de nM) através de embaralhamento de cadeia (Marks e colaboradores, *Bio/ Technology*, 10: 779-783 (1992)), bem como infecção combinatorial e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse e colaboradores, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Assim, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas de hibri-

doma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação pelos domínios constantes de cadeia pesada e
5 cadeia leve humana em lugar das sequências homólogas de murino (Patente U.S. Nº 4.816.567; e Morrison e colaboradores, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)) ou através de união covalente, à sequência de codificação de imunoglobulina, de toda ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo de não-imunoglobulina.

10 Tipicamente, tais polipeptídeos de não-imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo ou eles são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno e outro
15 sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno diferente.

(iii) Anticorpos humanizados

Métodos para humanização de anticorpos não humanos foram descritos na técnica. De preferência, um anticorpo humanizado tem um ou
20 mais resíduos de aminoácido introduzidos no mesmo a partir de uma fonte a qual é não-humana. Esses resíduos de aminoácido não-humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados" os quais são, tipicamente, tomados de um domínio variável "importado". Humanização pode ser realizada essencialmente seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones
25 e colaboradores, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann e colaboradores, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen e colaboradores, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), substituindo sequências de região hipervariável pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. Nº
30 4.816.567), em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, anticorpos humanizados são, tipicamente, anti-

corpos humanos nos quais alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos da FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, leve e pesado, a serem usados para fazer os anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim denominado método "best-fit", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada contra a biblioteca toda de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana a qual é mais próxima daquela do roedor é, então, aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims e colaboradores, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia e colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 196: 90.1 (1987)). Outro método usa uma região de estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo em particular de cadeias pesada ou leve. A mesma estrutura pode ser usada para diferentes anticorpos humanizados (Carter e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta e colaboradores, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade pelo antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para obter esse objetivo, de acordo com um método preferido, anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências precursoras e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências precursoras e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares para aqueles habilitados na técnica. Programas de computador estão disponíveis, os quais ilustram e mostram prováveis estruturas conformacionais tridimensionais de sequências de imunoglobulina candidatas. Inspeção dessas visualizações permite análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar a seu antígeno. Dessa forma, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir do recipiente e importar sequências de

modo que a característica desejada do anticorpo, tal como afinidade aumentada pelo(s) antígeno(s) alvo, seja obtida. Em geral, os resíduos de região hipervariável estão direta e mais substancialmente envolvidos ao influenciar a ligação a antígeno.

5 A Patente U.S. Nº 6.949.245 descreve a produção de anticorpos ao HER2 humanizados exemplificativos os quais se ligam ao HER2 e bloqueiam a ativação de ligante de um receptor HER. O anticorpo humanizado de interesse particular aqui bloqueia ativação EGF-, TGF- α e/ou HRG-mediada de MAPK essencialmente tão eficazmente quanto o anticorpo monoclonal de murino 2C4 (ou um fragmento Fab do mesmo). O anticorpo humanizado aqui pode, por exemplo, compreender resíduos de região hipervariável não humana incorporados em um domínio pesado variável humano e pode ainda compreender uma substituição na região de estrutura (FR) em uma posição selecionada do grupo consistindo de 69H, 71H e 73H utilizando o sistema de numeração de domínio variável apresentado em Kabat e colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Em uma modalidade, o anticorpo humanizado compreende substituições na FR em duas ou todas as posições 69H, 71H e 73H.

20 Um anticorpo humanizado exemplificativo de interesse aqui compreende os resíduos de determinação de complementaridade do domínio pesado variável GFTFTDYTMX, onde X é, de preferência, D ou S (SEQ ID NO: 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO: 8); e/ou NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 9), opcionalmente compreendendo modificações de aminoácido desses resíduos de CDR, por exemplo, onde as modificações mantêm essencialmente ou melhoram a afinidade do anticorpo. Por exemplo, a variante de anticorpo de interesse pode ter de cerca de uma a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácido nas sequências de CDR pesada variável acima. Tais variantes de anticorpo podem ser preparadas através de maturação por afinidade, por exemplo, conforme descrito abaixo. O anticorpo humanizado mais preferido compreende a sequência de aminoácido de domínio pesado variável SEQ ID NO: 4.

O anticorpo humanizado pode compreender resíduos de determinação de complementaridade de domínio leve variável KASQDVSIQVA (SEQ ID NO: 10); SASYX¹X²X³, onde X¹ é, de preferência, R ou L, X² é, de preferência, Y ou E e X³ é, de preferência, T ou S (SEQ ID NO: 11); e/ou
 5 QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 12), por exemplo, além daqueles resíduos de CDR de domínio pesado variável no parágrafo precedente. Tais anticorpos humanizados compreendem opcionalmente modificações de aminoácido dos resíduos de CDR acima, por exemplo, onde as modificações mantêm essencialmente ou melhoram a afinidade do anticorpo. Por exemplo, a variante de
 10 anticorpo de interesse pode ter de cerca de uma a cerca de sete ou cerca de cinco substituições de aminoácido nas sequências de CDR leve variável acima. Tais variantes de anticorpo podem ser preparadas através de maturação por afinidade, por exemplo, conforme descrito abaixo. O anticorpo humanizado mais preferido compreende a sequência de aminoácido de domínio
 15 leve variável em SEQ ID NO: 3.

O presente pedido também considera anticorpos maturados por afinidade os quais se ligam ao HER2 e bloqueiam a ativação de ligante de um receptor HER. O anticorpo precursor pode ser um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado, por exemplo, um compreendendo as sequências
 20 leve variável e/ou pesada variável de SEQ ID NOs: 3 e 4, respectivamente (isto é, compreendendo o V_L e/ou V_H do pertuzumab). O anticorpo maturado por afinidade, de preferência, se liga ao receptor HER2 com uma afinidade superior àquela do 2C4 de murino ou pertuzumab (por exemplo, uma afinidade aperfeiçoada de cerca de duas a cerca de quatro vezes, a cerca de
 25 100 vezes ou cerca de 1000 vezes, por exemplo, conforme avaliado usando um ELISA do domínio extracelular de HER2 (ECD). Resíduos de CDR pesada variável exemplificativos para substituição incluem H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete desses resíduos). Exemplos de resíduos de CDR
 30 leve variável para alteração incluem L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois a três, quatro, cinco ou até cerca de dez desses resíduos).

Várias formas do anticorpo humanizado ou do anticorpo maturado por afinidade são consideradas. Por exemplo, o anticorpo humanizado ou anticorpo maturado por afinidade pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um Fab, o qual é opcionalmente conjugado com um ou mais agentes citotóxicos, de forma a gerar um imunoc conjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado ou anticorpo maturado por afinidade pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo de IgG1 intacto. O anticorpo de IgG1 intacto preferido compreende a sequência de cadeia leve em SEQ ID NO: 13 e a sequência de cadeia pesada em SEQ ID NO: 14.

10 (iv) Anticorpos humanos

Como uma alternativa à humanização, anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, agora é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, quando de imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada (JH) do anticorpo em camundongos mutantes para linhagem germinativa e quimérica resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência do conjunto do gene de imunoglobulina de linhagem germinativa humana para tais camundongos mutantes para linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos quando de estímulo com antígeno. Veja, por exemplo, Jakobovits e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits e colaboradores, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann e colaboradores, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); e Patentes U.S. N°s 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807. Alternativamente, a tecnologia de phage display (McCafferty e colaboradores, *Nature* 348: 552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores imunizados.

30 De acordo com essa técnica, genes de domínio V de anticorpo são clonados em-rede em um gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd e visualizados

como fragmentos de anticorpo funcional sobre a superfície da partícula de fago. Em virtude do fato de a partícula filamentosa conter uma cópia de DNA fita simples do genoma do fago, seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resulta em seleção do gene que codifica o anticorpo exibindo essas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. Phage display pode ser realizado em uma variedade de formatos; para sua revisão veja, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de V-gene podem ser usadas para phage display. Clackson e colaboradores, *Nature*, 352: 624-628 (1991) isolaram uma série diversa de anticorpos anti-oxazolona de uma pequena biblioteca combinatorial aleatória de genes V derivados do baço de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos a uma diversa série de antígenos (incluindo auto-antígenos) pode ser isolada seguindo essencialmente as técnicas descritas por Marks e colaboradores, *J. Mol. Biol* 222: 581-597 (1991) ou Griffith e colaboradores, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Veja também Patentes U.S. Nºs 5.565.332 e 5.573.905.

Conforme discutido acima, anticorpos humanos podem também ser gerados por células B *in vitro* (veja Patentes 5.567.610 e 5.229.275).

Anticorpos ao HER2 humano são descritos na Patente U.S. Nº 5.772.997, emitida em 30 de Junho de 1998 e WO 97/00271 publicado em 3 de Janeiro de 1997.

(v) Fragmentos de anticorpo

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo compreendendo uma ou mais regiões de ligação a antígeno. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, por exemplo, Morimoto e colaboradores, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); e Brennan e colaboradores, *Science*, 229: 81 (1985)). Contudo, esses fragmentos agora podem ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isola-

dos das bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter e colaboradores, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para aqueles habilitados. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Veja WO 93/16185; Patente U.S. Nº 5.571.894; e Patente U.S. Nº 5.587.458.

10 O fragmento de anticorpo pode também ser um anticorpo Alinear®, por exemplo, conforme descrito na Patente U.S. Nº 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpo linear podem ser mono-específicos ou biespecíficos.

(vi) Anticorpos biespecíficos

15 Anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação por pelo menos dois epítopos diferentes. Anticorpos biespecíficos exemplificativos podem se ligar a dois epítopos diferentes da proteína de HER2. Outros de tais anticorpos podem combinar um sítio de ligação a HER2 com sítio(s) de ligação para EGFR, HER3 e/ou HER4. Alternativamente,

20 te, um braço de HER2 pode ser combinado com um braço o qual se liga a uma molécula de disparo sobre um leucócito, tal como uma molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou CD3) ou receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo a focalizar mecanismos de defesa celular à célula expressando HER2. Anti-

25 corpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos à células as quais expressam HER2. Esses anticorpos possuem um braço de ligação a HER2 e um braço o qual se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferon-α, vinca alcalóide, cadeia de ricina A, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Anticorpos biespecíficos podem

30 ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

O WO 96/16673 descreve um anticorpo ao HER2/FcγRIII bies-

pecífico e Patente U.S. Nº 5.837.234 divulga um anticorpo ao HER2/Fc γ RI biespecífico IDM1 (Osidem). Um anticorpo biespecífico ao HER2/Fc α é mostrado no WO98/02463. A Patente U.S. Nº 5.821.337 ensina um anticorpo ao HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 é um Ab ao 33-Fc γ RIII biespecífico.

5 Métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm diferentes especificidades (Millstein e colaboradores, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Em virtude da es-
10 colha aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, esses híbrido-
mas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 diferentes molé-
culas de anticorpo, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correta. Purificação da molécula correta, a qual usualmente é feita através de etapas de cromatografia por afinidade, é problemática e os rendimentos de produto
15 são baixos. Procedimentos similares são descritos no WO 93/08829 e em Traunecker e colaboradores, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combina-
ção de anticorpo-antígeno) são fundidos à sequências de domínio constante
20 de imunoglobulina. A fusão é, de preferência, com um domínio constante de
cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das
regiões de dobradiça, CH2 e CH3. É preferido ter a primeira região constan-
te de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para ligação à cadeia
leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs que codificam as fu-
25 sões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de
imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão distintos e são co-
transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isso proporciona
grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de
polipeptídeo em modalidades quando proporções desiguais das três cadeias
30 polipeptídicas usadas na estrutura proporcionam os rendimentos ótimos.
Contudo, é possível inserir as sequências de codificação para duas ou todas
as três cadeias polipeptídicas em um vetor de expressão quando a expres-

são de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em proporções iguais resulta em altos rendimentos ou quando as proporções não são de significância particular.

Em uma modalidade preferida dessa abordagem, os anticorpos
5 biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina hí-
brida com uma primeira especificidade de ligação em um braço e um par de
cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina (proporcionando uma segunda
especificidade de ligação) no outro braço. Descobriu-se que essa estrutura
10 facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de
cadeia de imunoglobulina indesejadas, uma vez que a presença de uma ca-
deia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífi-
ca proporciona uma forma fácil de separação. Essa abordagem é descrita no
WO 94/04690. Para outros detalhes de geração de anticorpos biespecíficos
veja, por exemplo, Suresh e colaboradores, *Methods in Enzymology*, 121:
15 210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente U.S. Nº
5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser ma-
nipulada para maximizar o percentual de heterodímeros os quais são recu-
perados da cultura de célula recombinante. A interface preferida compreen-
20 de pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anti-
corpo. Nesse método, uma ou mais pequenas cadeias laterais de aminoáci-
do da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por ca-
deias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano).

"Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s)
25 cadeia(s) lateral(is) maior(es) são criadas sobre a interface da segunda mo-
lécula de anticorpo substituindo grandes cadeias laterais de aminoácido pe-
las pequenas (por exemplo, alanina ou treonina). Isso proporciona um me-
canismo para aumentar o rendimento do heterodímero com relação a outros
subprodutos indesejados, tais como homodímeros.

30 Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos cruzadamente liga-
dos ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heterocon-
jugado pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina. Tais anticorpos, por

exemplo, foram propostos para objetivar células do sistema imune à células indesejadas (Patente U.S. Nº 4.676.980) e para tratamento de infecção pelo HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando quaisquer métodos de ligação cruzada convenientes. Agentes de ligação cruzada adequados são bem conhecidos na técnica e são descritos na Patente U.S. Nº 4.676.980, junto com uma série de técnicas de ligação cruzada.

Técnicas para geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo também foram descritos na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan e colaboradores, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Esses fragmentos são reduzidos na presença do agente de formação de complexo de ditiol, arsenita de sódio, para estabilizar ditióis proximais e impedir formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos $F(ab')_2$ gerados são, então, convertidos aos derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é, então, re-convertido ao Fab' -tiol através de redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progresso recente tem facilitado a recuperação direta de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, a qual pode ser quimicamente acoplada para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby e colaboradores, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo $F(ab')_2$ biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' foi separadamente secretado de *E. coli* e submetido a acoplamento químico direto *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar à células superexpressando o receptor HER2 e células T humanas normais, bem como disparar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

Várias técnicas para fabricação e isolamento de fragmentos de

anticorpo biespecífico diretamente a partir de cultura de células recombinantes também foram descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos têm sido produzidos usando zíperes de leucina. Kostelny e colaboradores, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes

5 através de fusão genética. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de dobradiça para formar monômeros e, então, reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Esse método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

10 90: 6444-6448 (1993) tem proporcionado um mecanismo alternativo para a fabricação de fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) através de um ligante o qual é muito curto para

15 permitir emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, desse modo, formando dois sítios de ligação a antígeno. Outra estratégia para fazer fragmentos de anticorpo biespecífico através do uso de dímeros

20 de Fv com cadeia simples (sFv) também foi reportada. Veja Gruber e colaboradores, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências são considerados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt e colaboradores, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

25 **(vii) Outras modificações de sequência de aminoácido**

Modificação(ões) de sequência de aminoácido dos anticorpos descritos aqui é(são) considerada(s). Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes de sequência de aminoácido do anticorpo são preparadas

30 através de introdução de alterações de nucleotídeo apropriadas no ácido nucleico do anticorpo ou através de síntese de peptídeo. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de e/ou inserções em e/ou substituições de

resíduos dentro das sequências de aminoácido do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para chegar às sequências do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para chegar à estrutura final, contanto que a estrutura final possua as características desejadas. As alterações de aminoácido também podem alterar processos pós-traducionais do anticorpo, tal como alteração do número ou posição de sítios de glicosilação.

Um método útil para identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são locais preferidos para mutagênese é denominado "mutagênese por exploração de alanina", conforme descrito por Cunningham e Wells *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (mais preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antígeno. Aqueles locais de aminoácido demonstrando sensibilidade funcional às substituições são, então, refinados através de introdução de outras variantes em ou para os locais de substituição. Assim, embora o sítio para introdução de uma variação de sequência de aminoácido seja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não precisa ser determinada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, exploração por ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as variantes de anticorpo expressas são selecionadas com relação à atividade desejada.

Inserções de sequência de aminoácido incluem fusões amino- e/ou carbóxi-terminais oscilando, quanto ao comprimento, de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de um único ou múltiplos resíduos de aminoácido. Exemplos de inserções terminais incluem anticorpo com um resíduo de metionila N-terminal ou o anticorpo fundido a um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes insercionais da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-termino do anticorpo a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipeptídeo o qual aumenta a meia-vida no soro do anticorpo.

- Outro tipo de variante é uma variante com substituição de aminoácido. Essas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese por substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações na FR também são consideradas. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o cabeçalho de "substituições preferidas". Se tais substituições resultam em uma alteração na atividade biológica, então, alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 1 ou conforme descrito abaixo em referência às classes de aminoácido, podem ser introduzidas e os produtos selecionados.

Tabela 1

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

- Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são realizadas através de seleção de substituições que diferem significativamente quanto a seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da parte principal polipeptídica na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo ou (c) o grosso da cadeia lateral. Aminoácidos podem ser

agrupados de acordo com similaridades nas propriedades de suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, em *Biochemistry*, segunda ed., páginas 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

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

10 Alternativamente, resíduos que ocorrem naturalmente podem ser
divididos em grupos baseado em propriedades em comum da cadeia lateral:

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

Substituições não conservativas requererão troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

20 Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da
conformação apropriada do anticorpo também podem ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir ligação cruzada anormal. Inversamente, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo para melhorar sua estabilidade (particularmente onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo, tal como um
25 fragmento Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante com substituição envolve substituição de um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo precursor (por exemplo, um anticorpo humano ou humanizado).
30 Geralmente, a(s) variante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas aperfeiçoadas com relação ao anticorpo precursor do qual ela(s) é(são) gerada(s). Uma forma conveniente para ge-

ração de tais variantes com substituição envolve maturação por afinidade usando phage display. Resumidamente, vários sítios de região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) sofrem mutação para gerar todas as possíveis substituições em cada sítio. As variantes de anticorpo assim geradas são mostradas de um modo monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusões ao produto do gene III de M13 acondicionado dentro de cada partícula. As variantes visualizadas em fago são, então, selecionadas com relação à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação), conforme aqui descrito. De forma a identificar sítios de região hipervariável candidatos para modificação, mutagênese por exploração de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação a antígeno. Alternativa ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura de cristal do complexo de antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e HER2 humano. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas aqui. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à seleção conforme descrito aqui e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Outro tipo de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alteração entenda-se deleção de uma ou mais porções carboidrato encontradas no anticorpo e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

Glicosilação de anticorpos é, tipicamente, N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à fixação da porção carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para fixação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada refere-se à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidróxi aminoácido, mais co-

mumente serina ou treonina, embora 5-hidróxiprolina ou 5-hidróxilisina também pode ser usada.

A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é, convenientemente, realizada através de alteração da sequência de aminoácido, de modo
5 que ela contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligada). A alteração também pode ser feita através da adição de ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligada).

10 Onde o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato preso à mesma pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com uma estrutura de carboidrato maduro que carece de fucose presa a uma região Fc do anticorpo são descritos no Pedido de Patente US Nº 2003/0157108 A1, Presta, L. Veja também US 20 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltda).
15 Anticorpos com uma N-acetilglicosamina de bisseção (GlcNAc) no carboidrato preso a uma região Fc do anticorpo são mencionados no WO03/011878, Jean-Mairet e colaboradores e Patente US Nº 6.602.684, Umana e colaboradores. Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo preso a uma região Fc do anticorpo são reportados no WO97/30087,
20 Patel e colaboradores. Veja também W098/58964 (Raju, S.) e W099/22764 (Raju, S.) referentes a anticorpos com carboidrato alterado preso à região Fc do mesmo.

Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com relação à função efetuada, por exemplo, de modo a intensificar a citotoxicidade
25 de célula-mediada antígeno-dependente (ADCC) e/ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC) do anticorpo. Isso pode ser obtido através de introdução de uma ou mais substituições de aminoácido em uma região Fc do anticorpo. Alternativa ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, desse modo, permitindo a formação de ligação
30 de dissulfeto intercadeia nessa região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização aperfeiçoada e/ou morte celular complemento-mediada e citotoxicidade celular anticorpo-dependente

(ADCC) aumentadas. Veja Caron e colaboradores, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade anti-tumor intensificada também podem ser preparados usando ligantes cruzados heterobifuncionais conforme descrito em Wolffs e colaboradores, *Câncer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser manipulado, o qual tem regiões Fc duplas e pode, assim, ter lise de complemento e capacidades de ADCC intensificadas. Veja Stevenson e colaboradores, *Anti-Câncer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

10 O WO00/42072 (Presta, L.) descreve anticorpos com função ADCC aperfeiçoada na presença de células efetadoras humanas, onde os anticorpos compreendem substituições de aminoácido na região Fc dos mesmos. De preferência, o anticorpo com ADCC aperfeiçoada compreende substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração EU de resíduos). De preferência, a região Fc alterada é uma região Fc de IgG1 humana compreendendo ou consistindo de substituições em uma, duas ou três dessas posições. Tais substituições são opcionalmente combinadas com substituição(ões) as quais aumentam a ligação a C1q e/ou CDC.

20 Anticorpos com ligação a C1q e/ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC) alterada são descritos no W099/51642, Patente US Nº 6.194.551 B1, Patente US Nº 6.242.195 B1, Patente US Nº 6.528.624 B1 e Patente US Nº 6.538.124 (Idusogie e colaboradores). Os anticorpos compreendem uma substituição de aminoácido em uma ou mais das posições de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da região Fc dos
25 mesmos (numeração EU de resíduos).

Para aumentar a meia-vida no soro do anticorpo, pode-se incorporar um epítipo de ligação a receptor de salvamento no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo), conforme descrito na Patente US 5.739.277, por exemplo. Conforme descrito aqui, o termo "epítipo de ligação a receptor de salvamento" refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo
30 aumento da meia-vida *in vivo* no soro da molécula de IgG.

Anticorpos com ligação aperfeiçoada ao receptor de Fc neonatal (FcRn) e meia-vida aumentada são descritos no WO00/42072 (Presta, L.) e US2005/0014934A1 (Hinton e colaboradores). Esses anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições, as quais melhoram a
 5 ligação da região Fc ao FcRn. Por exemplo, a região Fc pode ter substituições em uma ou mais das posições 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ou 434 (numeração EU de resíduos). A variante de anticorpo compreendendo região Fc preferida com ligação aperfeiçoada ao FcRn compreende
 10 substituições de aminoácido em uma, duas ou três posições 307, 308 e 434 da região Fc da mesma (numeração Eu de resíduos).

Anticorpos manipulados com três ou mais (de preferência quatro) sítios de ligação a antígeno funcionais também são considerados (Pedido US Nº. US2002/0004587 A1, Miller e colaboradores).

15 Moléculas de ácido nucleico que codificam variantes de sequência de aminoácido do anticorpo são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido que ocorrem naturalmente) ou preparo através de
 20 mutagênese oligonucleotídeo-mediada (ou sítio-dirigida), mutagênese por PCR e mutagênese por cassete de uma variante previamente preparada ou uma versão não-variante do anticorpo.

(viii) Seleção de anticorpos com as propriedades desejadas

Técnicas para a geração de anticorpos foram descritas acima.
 25 Pode-se selecionar ainda anticorpos com determinadas características biológicas, conforme desejado.

Para identificar um anticorpo o qual bloqueia a ativação de ligante de um receptor HER, a capacidade do anticorpo de bloquear a ligação de um ligante de HER à células expressando o receptor HER (por exemplo, em
 30 conjugação com outro receptor HER com o qual o receptor HER de interesse forma um hetero-oligômero de HER) pode ser determinada. Por exemplo, células expressando naturalmente ou transfectadas para expressar recepto-

res HER do hetero-oligômero de HER podem ser incubadas com o anticorpo e, então, expostas ao ligante de HER rotulado. A capacidade do anticorpo de bloquear a ligação de ligante ao receptor HER no hetero-oligômero de HER pode, então, ser avaliada.

5 Por exemplo, inibição de ligação de HER à linhagens de células de tumor de mama MCF7 por anticorpos ao HER2 podem ser obtida usando culturas de MCF7 em monocamadas sobre gelo em um formato de lâmina com 24 cavidades essencialmente conforme descrito na Patente U.S. Nº 6.949.245. anticorpos monoclonais ao HER2 podem ser adicionados a cada
10 cavidade e incubadas durante 30 minutos. RHRGp1₁₇₇₋₂₂₄ ¹²⁵I-rotulado (25 pm) pode, então, ser adicionado e a incubação pode ser continuada durante 4 a 16 horas. Curvas de dose-resposta podem ser preparadas e um valor de IC₅₀ pode ser calculado para o anticorpo de interesse. Em uma modalidade, o anticorpo o qual bloqueia a ativação de ligante de um receptor HER terá
15 uma IC₅₀ para inibição de ligação de HRG à células MCF7 nesse ensaio de cerca de 50 nM ou menos, mais preferivelmente 10 nM ou menos. Onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, a IC₅₀ para inibição de ligação de HRG à células MCF7 nesse ensaio pode, por exemplo, ser cerca de 100 nM ou menos, mais preferivelmente 50 nM ou
20 menos.

 Alternativa ou adicionalmente, a capacidade de um anticorpo de bloquear a fosforilação de tirosina ligante de HER-estimulada de um receptor HER presente em um hetero-oligômero de HER pode ser avaliada. Por exemplo, células expressando endogenamente os receptores HER ou trans-
25 fectadas para expressar os mesmos podem ser incubadas com o anticorpo e, então, ensaiadas com relação à atividade de fosforilação de tirosina ligante de HER-dependente usando um anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina (o qual é opcionalmente conjugado a um rótulo detectável). O ensaio de ativação de quinase de receptor descrito na Patente U.S. Nº 5.766.863 está tam-
30 bém disponível para determinação de ativação e bloqueio de receptor HER dessa atividade por um anticorpo.

 Em uma modalidade, pode-se selecionar um anticorpo o qual

inibe a estimulação por HRG de fosforilação de tirosina p180 em células MCF7 essencialmente conforme descrito na Patente U.S. Nº 6.949.245. Por exemplo, as células MCF7 podem ser colocadas em lâminas com 24 cavidades e anticorpos monoclonais ao HER2 podem ser adicionados a cada cavidade e incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente; então, r-
5 HRGp1_{177,244} pode ser adicionado a cada cavidade até uma concentração final de 0,2 nM e a incubação pode ser continuada durante 8 minutos. Meio pode ser aspirado de cada cavidade e as reações podem ser cessadas através da adição de 100 µl de tampão de amostra de SDS (SDS a 5%, DTT a
10 25 mM e Tris-HCl a 25 mM, pH de 6,8). Cada amostra (25 µl) pode ser submetida à eletroforese sobre um gel com gradiente de 4-12% (Novex) e, então, eletroforéticamente transferida para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. Immunoblots anti-fosfotirosina (a 1 µg/ml) podem ser reveladas e a intensidade da banda reativa predominante a M_r - 180.000 pode ser
15 quantificada através de densitometria por refletância. O anticorpo selecionado, de preferência, inibirá significativamente a estimulação por HRG de fosforilação de tirosina p180 em cerca de 0-35% do controle nesse ensaio. Uma curva de dose-resposta para inibição de estimulação por HRG de fosforilação de tirosina p180, conforme determinado através de densitometria por
20 refletância, pode ser preparada e uma IC₅₀ para o anticorpo de interesse pode ser calculada. Em uma modalidade, o anticorpo o qual bloqueia ativação de ligante de um receptor HER terá uma IC₅₀ para inibição de estimulação por HRG de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio de cerca de 50 nM ou menos, mais preferivelmente 10 nM ou menos. Onde o anticorpo é um frag-
25 mento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, a IC₅₀ para inibição de estimulação por HER de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio pode, por exemplo, ser cerca de 100 nM ou menos, mais preferivelmente 50 nM ou menos.

Pode-se também avaliar os efeitos inibitórios de crescimento do
30 anticorpo sobre células MDA-MB-175, por exemplo, conforme essencialmente descrito em Schaefer e colaboradores, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997). De acordo com esse ensaio, células MDA-MB-175 podem ser tratadas com

um anticorpo monoclonal ao HER2 (10 µg/mL) durante 4 dias e coradas com violeta cristal. Incubação com um anticorpo ao HER2 pode mostrar um efeito inibitório de crê sobre essa linhagem de célula similar àquele mostrado pelo anticorpo monoclonal 2C4. Em uma outra modalidade, HRG exógeno não
5 reverterá significativamente essa inibição. De preferência, o anticorpo será capaz de inibir a proliferação celular de células MDA-MB-175 em uma extensão maior do que o anticorpo monoclonal 4D5 (e opcionalmente em uma extensão maior do que o anticorpo monoclonal 3F7), na presença e na ausência de HRG exógeno.

10 Em uma modalidade, o anticorpo ao HER2 de interesse pode bloquear a associação heregulina-dependente de HER2 com HER3 em células MCF7 e SK-BR-3, conforme determinado em um experimento de coimunoprecipitação, tal como aquele descrito na Patente U.S. Nº 6.949.245 substancialmente mais eficazmente do que o anticorpo monoclonal 4D5 e, de
15 preferência, substancialmente mais eficazmente do que o anticorpo monoclonal 7F3.

Para identificar anticorpos HER2 inibitórios de crescimento, pode-se selecionar anticorpos os quais inibem o crescimento de células câncêrigenas as quais superexpressam HER2. Em uma modalidade, o anticorpo
20 inibitório de crescimento de escolha é capaz de inibir o crescimento de células SK-BR-3 em cultura de células em cerca de 20-100% e, de preferência, em cerca de 50-100% em uma concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar tais anticorpos, o ensaio com SK-BR-3 descrito na Patente U.S. Nº 5.677.171 pode ser realizado. De acordo com esse ensaio,
25 células SK-BR-3 são crescidas em uma mistura a 1:1 de meio F12 e DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10%, glutamina e penicilina/estrepomicina. As células SK-BR-3 são colocadas a 20.000 células em um disco de cultura de células de 35 mm (2 ml/disco de 35 mm). 0,5 a 30 µg/ml do anticorpo HER2 são adicionados por disco. Após seis dias, o número de células,
30 comparado com as células não tratadas, é contado usando um contador de células eletrônico COULTER®. Aqueles anticorpos os quais inibem o crescimento de células SK-BR-3 em cerca de 20-100% ou cerca de 50-100%

podem ser selecionados como anticorpos inibitórios de crescimento. Veja Pat. U.S. Nº. 5.677.171 para ensaios para seleção de anticorpos inibitórios de crescimento, tais como 4D5 e 3E8.

De forma a selecionar anticorpos os quais induzem à apoptose, um ensaio de ligação à anexina usando células BT474 está disponível. As células BT474 são cultivadas em discos conforme discutido no parágrafo precedente. O meio é, então, removido e substituído por meio fresco apenas ou meio contendo 10 µg/ml do anticorpo monoclonal. Após um período de incubação de três dias, monocamadas são lavadas com PBS e soltas através de tripsinização. As células são, então, centrifugadas em tampão de ligação de Ca^{2+} e transformadas em alíquotas em tubos conforme discutido acima para o ensaio de morte celular. Os tubos, então, recebem anexina rotulada (por exemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml). As amostras podem ser analisadas usando um citômetro de fluxo FACSCAN® e o software FACS-CONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Aqueles anticorpos os quais induzem a níveis estatisticamente significativos de ligação à anexina com relação ao controle são selecionados como anticorpos que induzem à apoptose. Além do ensaio de ligação à anexina, um ensaio de coloração de DNA usando células BT474 está disponível.

De forma a realizar esse ensaio, células BT474 as quais tenham sido tratadas com o anticorpo de interesse conforme descrito nos dois parágrafos precedentes são incubadas com 9 µg/ml de HOECHST 33342® durante 2 horas a 37°C, então, analisadas em um citômetro de fluxo EPICS ELITE® (Coulter Corporation) usando o software MODFIT LT® (Verity Software House). Anticorpos os quais induzem a uma alteração no percentual de células apoptóticas a qual é 2 vezes ou maior (e, de preferência, 3 vezes ou maior) do que células não tratadas (até 100% de células apoptóticas) podem ser selecionados como anticorpos pró-apoptóticos usando esse ensaio. Veja W098/17797 para ensaios para seleção de anticorpos os quais induzem à apoptose, tais como 7C2 e 3F3.

Para selecionar anticorpos os quais se ligam a um epítopo sobre o HER2 ligado por um anticorpo de interesse, um ensaio de bloqueio cruza-

do de rotina, tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser realizado para avaliar se o anticorpo bloqueia cruzadamente a ligação de um anticorpo, tal como 2C4 ou pertuzumab, ao HER2. alternativa ou adicionalmente, mapeamento de epítopo pode ser realizado através de métodos conhecidos na técnica e/ou pode-se estudar a estrutura de anticorpo-HER2 (Franklin e colaboradores, *Câncer Cell* 5: 317-328 (2004)) para ver qual(is) domínio(s) do HER2 é(são) ligado(s) pelo anticorpo.

(ix) Composições de pertuzumab

Em uma modalidade de uma composição de anticorpo HER2, a composição compreende uma mistura de um anticorpo de pertuzumab de espécie principal e uma ou mais variantes do mesmo. A modalidade preferida aqui de um anticorpo de pertuzumab de espécie principal é uma compreendendo as sequências de aminoácido leve variável e pesada variável selecionadas de SEQ ID N°s 3 e 4 e, mais preferivelmente, compreendendo uma sequência de aminoácido de cadeia leve selecionada de SEQ ID NO: 13 e 17 e uma sequência de aminoácido de cadeia pesada selecionada de SEQ ID NO: 14 e 18 (incluindo variantes deamidadas e/ou oxidadas dessas sequências). Em uma modalidade, a composição compreende uma mistura do anticorpo de pertuzumab de espécie principal e uma variante de sequência de aminoácido do mesmo compreendendo uma extensão líder amino-terminal. De preferência, a extensão líder amino-terminal está sobre uma cadeia leve da variante de anticorpo (por exemplo, sobre uma ou duas cadeias leves da variante de anticorpo). O anticorpo HER2 de espécie principal ou a variante de anticorpo pode ser um anticorpo de comprimento total ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento Fab ou F(ab)'₂) mas, de preferência, ambos são anticorpos de comprimento total. A variante de anticorpo aqui pode compreender uma extensão líder amino-terminal sobre qualquer uma ou mais das cadeias pesada ou leve da mesma. De preferência, a extensão líder amino-terminal está sobre uma ou duas cadeias leves do anticorpo. A extensão líder amino-terminal compreende ou, de preferência, consiste de VHS-. A presença da extensão líder amino-terminal na com-

posição pode ser detectada através de várias técnicas analíticas incluindo, mas não limitado a, análise de sequência N-terminal, ensaio com relação à heterogeneidade de carga (por exemplo, cromatografia de troca de cátions ou eletroforese em zona capilar), espectrometria de massa, etc. A quantidade da variante de anticorpo na composição geralmente oscila de uma quantidade que constitui o limite de detecção de qualquer ensaio (de preferência, análise de sequência N-terminal) usada para detectar a variante em uma quantidade menor do que a quantidade do anticorpo de espécie principal. Geralmente, cerca de 20% ou menos (por exemplo, de cerca de 1% a cerca de 15%, por exemplo, de 5% a cerca de 15%) das moléculas de anticorpo na composição compreendem uma extensão líder amino-terminal. Tais quantidades percentuais são, de preferência, determinadas usando análise de sequência N-terminal quantitativa ou análise de troca de cátions (de preferência, usando uma coluna de troca de cátions fraca de alta resolução, tal como uma coluna de troca de cátions aPROPAC WCX-10®). Além da variante com extensão líder amino-terminal, outras alterações de sequência de aminoácido do anticorpo de espécie principal e/ou variante são consideradas incluindo, mas não limitado a, um anticorpo compreendendo um resíduo de lisina C-terminal sobre uma ou ambas as cadeias pesadas do mesmo, uma variante de anticorpo deamidada, etc.

Além disso, o anticorpo de espécie principal ou variante pode ainda compreender variações de glicosilação, exemplos não limitativos das quais incluem um anticorpo compreendendo uma estrutura de oligossacarídeo G1 ou G2 presa à região Fc do mesmo, um anticorpo compreendendo uma porção de carboidrato presa a uma cadeia leve do mesmo (por exemplo, uma ou duas porções de carboidrato, tais como glicose ou galactose, presas a uma ou duas cadeias leves do anticorpo, por exemplo, presas a um ou mais resíduos de lisina), um anticorpo compreendendo uma ou duas cadeias pesadas não glicosiladas ou um anticorpo compreendendo um oligossacarídeo sialilado preso a uma ou duas cadeias pesadas do mesmo, etc.

A composição pode ser recuperada de uma linhagem de célula geneticamente manipulada, por exemplo, uma linhagem de célula de Ovário

de Hâmster Chinês (CHO) expressando o anticorpo HER2 ou pode ser preparada através de síntese de peptídeo.

(x) Imunoconjugados

A invenção também refere-se a imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, uma toxina de pequena molécula ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes da mesma) ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

Agentes quimioterapêuticos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de pequena molécula, tal como uma calicheamicina, uma maytansina (Patente U.S. Nº 5.208.020), um tricoteno e CC1065 também são considerados aqui.

Em uma modalidade preferida da invenção, o anticorpo é conjugado a uma ou mais moléculas de maytansina (por exemplo, cerca de 1 a cerca de 10 moléculas de maytansina por molécula de anticorpo). Maytansina pode, por exemplo, ser convertida a May-SS-Me, o qual pode ser reduzido a May-SH3 e reagido com anticorpo modificado (Chari e colaboradores, *Câncer Research* 52: 127-131 (1992)) para gerar um imunoconjugado de maytansinóide-anticorpo.

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado a uma ou mais moléculas de calicheamicina. A família de antibióticos de calicheamicina é capaz de produzir DNA fita-dupla que rompe em concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais de calicheamicina os quais podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG e θ_1^I (Hinman e colaboradores, *Câncer Research* 53: 3336-3342 (1993) e Lode e colaboradores, *Câncer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Veja também Patentes US Nºs 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; e 5.773.001, expressamente incorporada aqui por referência.

Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas os quais podem ser usados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos de

não ligação de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja, por exemplo, WO 93/21232 publicado em 28 de Outubro de 1993.

A presente invenção ainda considera um imunoconjugado formado entre um anticorpo e um componente com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA, tal como deóxiribonuclease; DNase).

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

Conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser feitas usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometil), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tal como HCl de dimetil adipimidato), ésteres ativos (tal como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazôniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolileno) e compostos de flúor bis-ativo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada conforme descrito em Vitetta e colaboradores, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triamina pentaacético (MX-DTPA) carbono-14-rotulado é um agente de quelação exemplificativo para conjugação de radionuclídeo ao anticorpo. Veja WO94/11026.

O ligante pode ser um ligante Acleavable® que facilita a liberação do fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, um ligante ácido-lábil, um ligante peptidase-sensível, ligante de dimetila ou ligante contendo dissulfeto

(Chari e colaboradores, *Câncer Research* 52: 127-131 (1992)) pode ser usado.

Alternativamente, uma proteína de fusão compreendendo o anticorpo e agente citotóxico pode ser feita, por exemplo, através de técnicas recombinantes ou síntese de peptídeo.

Outros imunoconjugados são considerados aqui. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a um de uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo também pode estar encerrado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial (por exemplo, hidróximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de (poli)metil metacrilato, respectivamente), em sistemas de distribuição de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, micro-emulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macro-emulsões. Tais técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Oslo, A., Ed., (1980).

Os anticorpos descritos aqui também podem ser formulados como imunolipossomas. Lipossomas contendo o anticorpo são preparados através de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang e colaboradores, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); Pats. U.S. Nos. 4.485.045 e 4.544.545; e W097/38731, publicado em 23 de Outubro de 1997. Lipossomas com tempo de circulação intensificado são descritos na Patente U.S. Nº 5.013.556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados através do método de evaporação em fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidil colina, colesterol e fosfatidil etanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para proporcionar lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas conforme descrito em Martin e colaboradores, *J. Biol.*

Chem. 257: 286-288 (1982) via uma reação de inter-alteração de dissulfeto. Um agente quimioterapêutico está opcionalmente contido dentro do lipossoma. Veja Gabizon e colaboradores, *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484 (1989).

5 **III. Seleção de pacientes para terapia**

O paciente aqui é submetido a um teste diagnóstico antes de terapia. Geralmente, se um teste diagnóstico é realizado, uma amostra pode ser obtida de um paciente que precisa de terapia. Onde o indivíduo tem câncer, a amostra pode ser uma amostra de tumor ou outra amostra biológica, tal como um fluido biológico incluindo, sem limitação, sangue, urina, saliva, fluido de ascite ou derivados, tais como soro sanguíneo e plasma sanguíneo e semelhantes.

Onde o ensaio diagnóstico é realizado em uma amostra de tumor, a amostra de tumor pode ser de um câncer ovariano, câncer peritoneal, câncer do tubo falopiano, câncer de mama metastático (MBC), câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de próstata ou tumor de câncer cólon-retal, etc. A amostra biológica aqui pode ser uma amostra fixada, por exemplo, uma amostra fixada em formalina, uma amostra incrustada em parafina (FFPE) ou uma amostra congelada.

Em uma modalidade, o nível de EGF e/ou TGF-alfa no paciente é avaliado, em que um nível elevado do mesmo comparado com níveis normais indica que o paciente é um candidato para terapia com um inibidor de dimerização de HER. Tais níveis de EGF e/ou TGF-alfa podem ser avaliados *in vivo* ou em várias amostras biológicas tomadas do paciente. De preferência, contudo, a amostra biológica testada é uma amostra de soro ou plasma.

Vários métodos para determinação de expressão de mRNA ou proteína incluem, mas não estão limitados a, caracterização de perfil de expressão de gene, reação em cadeia de polimerase (PCR), incluindo PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), análise de microarranjo, análise serial de expressão de gene (SAGE), MassARRAY, Análise de Expressão de Gene através de Sequenciamento por Assinatura Paralela (MPSS), proteômica, imunohistoquímica (IHC), etc. De preferência, mRNA é quantificado.

Tal análise de mRNA é, de preferência, realizada usando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou através de análise de microarranjo. Onde PCR é empregada, uma forma preferida de PCR é PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Em uma modalidade, expressão de um ou mais dos genes mencionados acima é considerada expressão positiva se ela está em um nível médio ou acima, por exemplo, comparado com outras amostras do mesmo tipo de tumor. O nível de expressão pode ser determinado de modo essencialmente contemporâneo com medição de expressão de gene ou pode ter sido determinado previamente.

As etapas de um protocolo representativo para caracterização de perfil de expressão de gene usando tecidos fixados, incrustados em parafina como a fonte de RNA, incluindo isolamento de RNA, purificação, extensão de iniciador e amplificação, são fornecidas em vários artigos de jornal publicados (por exemplo, Godfrey e colaboradores, *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht e colaboradores, *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Resumidamente, um processo representativo começa com corte de seções de cerca de 10 microgramas de espessura de amostras de tecido de tumor incrustadas em parafina. O RNA é, então, extraído e proteína e DNA são removidos. Após análise da concentração de RNA, etapas de reparo de RNA e/ou amplificação podem ser incluídas, se necessário, e o RNA é transcrito inversamente usando promotores gene-específicos, seguido por PCR. Finalmente, os dados são analisados para identificar a(s) melhor(es) opção(ões) de tratamento disponível(eis) para o paciente com base no padrão de expressão de gene característico identificado na amostra de tumor examinada.

Um protocolo de bioensaio ELISA do soro específico é fornecido no Exemplo 1.

EGF e/ou TGF-alfa também pode ser avaliado usando um ensaio diagnóstico *in vivo*, por exemplo, através de administração de uma molécula (tal como um anticorpo) a qual se liga à molécula a ser detectada e é rotulada com um rótulo detectável (por exemplo, um isótopo radioativo) e exploração externa do paciente para localização do rótulo.

Além de avaliação de EGF e/ou TGF-alfa, pode-se determinar expressão ou amplificação de HER no câncer. Vários ensaios diagnósticos/prognósticos estão disponíveis para isso. Em uma modalidade, superexpressão de HER pode ser analisada através de IHC, por exemplo, usando o

5 HERCEPTEST® (Dako). Seções de tecido incrustadas em parafina de uma biópsia de tumor podem ser submetidas ao ensaio IHC e classificadas com critérios de intensidade de coloração de proteína de HER2 como segue:

Score 0 - nenhuma coloração é observada ou coloração da membrana é observada em menos de 10% das células tumorígenas

10 Score 1+ - uma coloração desbotada/difícilmente perceptível da membrana é observada em mais de 10% das células tumorígenas. As células são coradas apenas em parte de sua membrana

Score 2+ - uma coloração fraca a moderadamente completa da membrana é observada em mais de 10% das células tumorígenas

15 Score 3+ - uma coloração moderada a fortemente completa da membrana é observada em mais de 10% das células tumorígenas

Aqueles tumores com escores 0 ou 1+ para avaliação de superexpressão de HER2 podem ser caracterizados como não superexpressando HER2, enquanto que aqueles tumores com escores 2+ ou 3+ podem ser ca-

20 racterizados como superexpressando HER2.

Tumores superexpressando HER2 podem ser classificados através de escores imunohistoquímicos correspondendo ao número de cópias de moléculas de HER2 expressas por célula e pode ser determinado bioquimicamente:

25 0 = 0-10.000 cópias/célula,
 1+ = pelo menos cerca de 200.000 cópias/célula,
 2+ = pelo menos cerca de 500.000 cópias/célula,
 3+ = pelo menos cerca de 2.000.000 cópias/célula.

Superexpressão de HER2 ao nível 3+, o qual leva à ativação

30 ligante-dependente da quinase de tirosina (Hudziak e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7159-7163 (1987)), ocorre em aproximadamente 30% dos tumores de mama e, nesses pacientes, a sobrevivência isenta de

reincidência e a sobrevivência global são diminuídas (Slamon e colaboradores, *Science*, 244: 707-712 (1989); Slamon e colaboradores, *Science*, 235: 177-182(1987)).

5 Alternativa ou adicionalmente, ensaios FISH, tal como o INFORM® (vendido pela Ventana, Arizona) ou PATHVISION® (Vysis, Illinois) podem ser realizados sobre tecido de tumor incrustado em parafina, fixado em formalina para determinar a extensão (se houver) de amplificação de HER2 no tumor.

10 Em uma modalidade, o câncer será um o qual expressa (e pode superexpressar) EGFR, tal expressão podendo ser avaliada conforme os métodos para avaliação de expressão de HER2 mencionados acima.

IV. Formulações farmacêuticas

Formulações farmacêuticas dos inibidores de dimerização de HER de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento através de mistura de um anticorpo tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis (Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), geralmente na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Cristais de anticorpo são também considerados (veja Pedido de Pat. US 2002/0136719).

15 Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os recipientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecil dimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos, tais como metil ou propil parabeno; cetacol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como

25 glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes de quelação, tal como EDTA; açúcares, tais como sacarose, mani-

30

tol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal, tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG). Formulações de anticorpo liofilizadas são descritas no WO 97/04801,

5 expressamente incorporado aqui por referência.

A formulação de pertuzumab preferida para uso terapêutico compreende 30 mg/mL de pertuzumab em acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, polisorbato 20 a 0,02% em um pH de 6,0. Uma formulação de pertuzumab alternativa compreende 25 mg/mL de pertuzumab,
10 tampão de histidina-HCl a 10 mM, sacarose a 240 mM, polisorbato 20 a 0,02%, pH de 6,0.

A formulação aqui pode também conter mais de um composto ativo, conforme necessário para a indicação que está sendo tratada em particular, de preferência aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente uns aos outros. Vários fármacos os quais podem ser
15 combinados com o inibidor de dimerização de HER são descritos na Seção Métodos abaixo. Tais moléculas estão, adequadamente, presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

Os ingredientes ativos também podem estar encerrados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidróximetil celulose ou gelatina e microcápsulas de (poli)metil metacrilato, respectivamente, em sistemas de distribuição de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em
25 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

Preparados com liberação sustentada podem ser feitos. Exemplos adequados de preparados com liberação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros sólidos hidrofóbicos contendo o anticorpo, matrizes as quais estão na forma de artigos formatados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes com liberação sustentada incluem
30 poliésteres, hidrogéis (por exemplo, (poli)2-hidróxietil metacrilato ou álcool

(poli)vinílico), polilactídeos (Pat. U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tal como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidróxibutírico.

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é prontamente obtido por meio de filtração através de uma série de membranas de filtração.

V. Tratamento com inibidores de dimerização de HER

A invenção aqui proporciona um método para prolongar a sobrevivência em um paciente com câncer que produz um nível elevado de EGF e/ou TGF-alfa, compreendendo administração de um inibidor de dimerização de HER ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do paciente. De preferência, o inibidor de dimerização de HER é um inibidor de dimerização de HER2 e/ou inibe a heterodimerização de HER.

Métodos para identificar pacientes candidatos à terapia com um inibidor de dimerização de HER foram discutidos na Seção III acima.

Exemplos de vários cânceres que podem ser tratados com um inibidor de dimerização de HER são listados na seção definições acima. Indicações de câncer preferidas incluem câncer ovariano; câncer peritoneal; câncer do tubo falopiano; câncer de mama, incluindo câncer de mama metastático (MBC); câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC); câncer de próstata; e câncer cólon-retal. Em uma modalidade, o câncer o qual é tratado é câncer avançado, resistente, recorrente, resistente à quimioterapia e/ou resistente à platina.

Terapia com o inibidor de dimerização de HER prolonga o TTP e/ou sobrevivência. Em uma modalidade, terapia com o inibidor de dimerização de HER prolonga a TTP ou sobrevivência pelo menos cerca de 5% ou pelo menos 10% ou pelo menos 15% ou pelo menos 20% ou pelo menos 25% mais do que o TTP ou sobrevivência obtida através de administração de um agente anti-tumor aprovado, ou padrão de assistência, para o câncer que está sendo tratado.

Na modalidade preferida, a invenção proporciona um método para prolongar o tempo para progressão da doença (TTP) ou sobrevivência em um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo falopiano, cujo câncer mostra ativação de HER2, compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga o TTP ou sobrevivência do paciente. O paciente pode ter câncer ovariano, peritoneal ou do tubo falopiano avançado, resistente, recorrente, resistente à quimioterapia e/ou resistente à platina. Administração de pertuzumab ao paciente pode, por exemplo, prolongar o TTP ou sobrevivência pelo menos cerca de 5% ou pelo menos 10% ou pelo menos 15% ou pelo menos 20% ou pelo menos 25% mais do que o TTP ou sobrevivência obtida através de administração de topotecan ou doxorubicina lipossômica a tal paciente.

O inibidor de dimerização de HER é administrado a um paciente humano de acordo com métodos conhecidos, tal como administração intravenosa, por exemplo, como um bolo ou através de infusão contínua durante um período de tempo, através das vias intramuscular, intraperitoneal, intracérebro-espinhal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, tópica ou inalação. Administração intravenosa do anticorpo é preferida.

Para a prevenção ou tratamento de câncer, a dose de inibidor de dimerização de HER dependerá do tipo de câncer a ser tratado, conforme definido acima, da gravidade e curso do câncer, se o anticorpo é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, a história clínica do paciente e resposta ao anticorpo e o critério do médico que faz o atendimento.

Em uma modalidade, uma dose fixa de inibidor de dimerização de HER é administrada. A dose fixa pode, adequadamente, ser administrada ao paciente de uma vez ou durante uma série de tratamentos. Onde uma dose fixa é administrada, de preferência, ela está na faixa de cerca de 20 mg a cerca de 2000 mg do inibidor de dimerização de HER. Por exemplo, a dose fixa pode ser de aproximadamente 420 mg, aproximadamente 525 mg, aproximadamente 840 mg ou aproximadamente 1050 mg do inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab.

Onde uma série de doses são administradas, essas podem, por exemplo, ser administradas aproximadamente a cada semana, aproximadamente a cada 2 semanas, aproximadamente a cada 3 semanas ou aproximadamente a cada 4 semanas mas, de preferência, aproximadamente a cada 3 semanas. As doses fixas podem, por exemplo, continuar a ser administradas até progressão da doença, evento adverso ou outro tempo, conforme determinado pelo médico. Por exemplo, de cerca de duas, três ou quatro até cerca de 17 ou mais doses fixas podem ser administradas.

Em uma modalidade, uma ou mais doses de carregamento do anticorpo são administradas, seguido por uma ou mais doses de manutenção do anticorpo. Em outra modalidade, uma pluralidade da mesma dose é administrada ao paciente.

De acordo com uma modalidade preferida da invenção, uma dose fixa de inibidor de dimerização de HER (por exemplo, pertuzumab) de aproximadamente 840 mg (dose de carregamento) é administrada, seguido por uma ou mais doses de aproximadamente 420 mg (dose(s) de manutenção) do anticorpo. As doses de manutenção são, de preferência, administradas a cerca de cada 3 semanas, durante um total de pelo menos duas doses, até 17 ou mais doses.

De acordo com outra modalidade preferida da invenção, uma ou mais doses fixas de aproximadamente 1050 mg do inibidor de dimerização de HER (por exemplo, pertuzumab) são administradas, por exemplo, a cada 3 semanas. De acordo com essa modalidade, uma, duas ou mais doses fixas são administradas, por exemplo, durante até um ano (17 ciclos) e mais conforme desejado.

Em outra modalidade, uma dose fixa de aproximadamente 1050 mg do inibidor de dimerização de HER (por exemplo, pertuzumab) é administrada como uma dose de carregamento, seguido por uma ou mais doses de manutenção de aproximadamente 525 mg. Cerca de uma, duas ou mais doses de manutenção são administradas ao paciente a cada 3 semanas de acordo com essa modalidade.

Embora o inibidor de dimerização de HER possa ser administra-

do como um único agente anti-tumor, o paciente é opcionalmente tratado com uma combinação do inibidor de dimerização de HER e um ou mais agentes quimioterapêuticos. De preferência, pelo menos um dos agentes quimioterapêuticos é um agente quimioterapêutico anti-metabólito, tal como

5 gemcitabina. A administração combinada inclui coadministração ou administração concorrente, usando formulações distintas ou uma única formulação farmacêutica e administração consecutiva em qualquer ordem em que, de preferência, há um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas. Assim, o agente

10 quimioterapêutico anti-metabólito pode ser administrado antes ou após administração do inibidor de dimerização de HER. Nessa modalidade, o tempo entre pelo menos uma administração do agente quimioterapêutico anti-metabólito e a administração de pelo menos um inibidor de dimerização de HER é, de preferência, de aproximadamente 1 mês ou menos e, mais preferivelmente, aproximadamente 2 semanas ou menos. Alternativamente, o agente quimioterapêutico anti-metabólito e o inibidor de dimerização de HER são administrados concorrentemente ao paciente, em uma única formulação ou em formulações distintas. Tratamento com a combinação do agente quimioterapêutico (por exemplo, agente quimioterapêutico anti-metabólito, tal

15 como gemcitabina) e o inibidor de dimerização de HER (por exemplo, pertuzumab) pode resultar em um benefício terapêutico sinérgico ou mais do que aditivo para o paciente.

Um agente quimioterapêutico anti-metabólito, se administrado, usualmente é administrado em dosagens conhecidas para o mesmo ou opcionalmente diminuído em virtude da ação combinada dos fármacos ou efeitos colaterais negativos atribuíveis à administração do agente quimioterapêutico anti-metabólico. O preparo e esquemas de dosagem para tais agentes quimioterapêuticos podem ser usados de acordo com as instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente por aqueles habilitados.

25

30 Onde o agente quimioterapêutico anti-metabólito é gemcitabina, de preferência, ele é administrado em uma dose entre cerca de 600 mg/m² a 1250 mg/m² (por exemplo, aproximadamente 1000 mg/m²), por exemplo, nos dias

1 e 8 de um ciclo de 3 semanas.

Além do inibidor de dimerização de HER e agente quimioterapêutico anti-metabólito, outros regimes terapêuticos podem ser combinados com os mesmos. Por exemplo, um segundo (terceiro, quatro, etc.) agente quimioterapêutico pode ser administrado, em que o segundo agente quimioterapêutico é outro agente quimioterapêutico anti-metabólito diferente ou um agente quimioterapêutico que não é um anti-metabólito. Por exemplo, o segundo agente quimioterapêutico pode ser um taxano (tal como paclitaxel ou docetaxel), capecitabina ou agente quimioterapêutico baseado em platina (tal como carboplatina, cisplatina ou oxaliplatina), antraciclina (tal como doxorubicina, incluindo doxorubicina lipossômica), topotecan, pemetrexed, vinca alcalóide (tal como vinorelbina) e TLK 286. ACocktails® de diferentes agentes quimioterapêuticos podem ser administrados.

Outros agentes terapêuticos que podem ser combinados com o inibidor de dimerização de HER incluem qualquer um ou mais de: um segundo inibidor de dimerização de HER diferente (por exemplo, um anticorpo HER2 inibitório de crescimento tal como trastuzumab ou um anticorpo HER2 o qual induz à apoptose de uma célula superexpressando HER2, tal como 7C2, HER3, HER4; compostos anti-hormonal, por exemplo, um composto anti-estrogênio, tal como tamoxifeno ou um inibidor de aromatase; um cardioprotetor (para prevenir ou reduzir qualquer disfunção do miocárdio associada à terapia); uma citocina; um fármaco EGFR-objetivado (tal como TARCEVA®, IRESSA® ou cetuximab); um agente anti-angiogênico (especialmente bevacizumab vendido pela Genentech sob a marca comercial AVASTIN®); um inibidor de quinase de tirosina; um inibidor de COX (por exemplo, um inibidor de COX-1 ou COX-2); fármaco anti-inflamatório não esteroide, celecoxib (CELEBREX®); inibidor de farnesil transferase (por exemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponível da Johnson and Johnson ou Lonafarnib SCH66336 disponível da Schering-Plough); anticorpo que se liga à proteína oncofetal CA 125, tal como Oregovomab (MoAb B43.13); vacina de HER2 (tal como vacina HER2 AutoVac da Pharmexia ou vacina de proteína APC8024 da Dendreon ou vacina de peptídeo de HER2 da GSK/Corixa);

outra terapia de objetivação de HER (por exemplo, trastuzumab, cetuximab, ABX-EGF, EMD7200, gefitinib, erlotinib, CP724714, CI1033, GW572016, EV1C-11F8, TAK165, etc); inibidor de Raf e/ou ras (veja, por exemplo, WO 2003/86467); injeção de lipossoma de HCl de doxorubicina (DOXIL®); inibi-

5 dor de topoisomerase I, tal como topotecan; taxano; e inibidor duplo de quí-
nase de tirosina de HER2 e EGFR, tal como lapatinib/GW572016; TLK286
(TELCYTA®); EMD-7200; um medicamento que trata náusea, tal como um
antagonista de serotonina ou benzodiazepina; um medicamento que previne
ou trata rash cutâneo ou terapias padrões para acne, incluindo um antibiótico

10 oral ou tópico; um medicamento que trata ou previne diarreia; um medica-
mento para redução da temperatura corporal, tal como acetaminophen, dife-
nidramina ou meperidina; fator de crescimento hematopoiético, etc.

Dosagens adequadas para qualquer um dos agentes co-admi-
nistrados acima são aquelas presentemente usadas e podem ser diminuídas

15 em virtude de ação combinada (sinergia) do agente e do inibidor de dime-
rização de HER.

Além dos regimes terapêuticos acima, o paciente pode ser sub-
metido à remoção cirúrgica de células cancerígenas e/ou terapia de radia-
ção.

20 Onde o inibidor é um anticorpo, de preferência, o anticorpo ad-
ministrado é um anticorpo nu. Contudo, o inibidor administrado pode ser con-
jugado com um agente citotóxico. De preferência, o inibidor conjugado e/ou
antígeno ao qual ele está ligado é internalizado pela célula, resultando em
eficácia terapêutica aumentada do conjugado na morte da célula canceríge-

25 na à qual ele se liga. Em uma modalidade preferida, o agente citotóxico obje-
tiva ou interfere com o ácido nucleico na célula cancerígena. Exemplos de
tais agentes citotóxicos incluem maytansinóides, calicheamicinas, ribonucle-
ases e endonucleases de DNA.

O presente pedido considera administração do inibidor de dime-
rização de HER através de terapia genética. Veja, por exemplo, WO96/07321

30 publicado em 14 de Março de 1996, referente ao uso de terapia genética
para gerar anticorpos intracelulares.

Existem duas abordagens principais para colocar o ácido nucleico (opcionalmente contido em um vetor) nas células do paciente; *in vivo* e *ex vivo*. Para distribuição *in vivo*, o ácido nucleico é injetado diretamente no paciente, usualmente no local onde o anticorpo é requerido. Para tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucleico é introduzido nessas células isoladas e as células modificadas são administradas ao paciente diretamente ou, por exemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas as quais são implantadas no paciente (veja, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 4.892.538 e 5.283.187). Há uma variedade de técnicas disponíveis para introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo se o ácido nucleico é transferido para células cultivadas *in vitro* ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. Técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico em células de mamífero *in vitro* incluem o uso de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão de célula, DEAE-dextrana, o método de precipitação com fosfato de cálcio, etc. Um vetor comumente usado para distribuição *ex vivo* do gene é um retrovírus.

As técnicas de transferência de ácido nucleico *in vivo* presente-mente preferidas incluem a transfecção com vetores virais (tais como adenovírus, vírus do Herpes simplex I ou vírus adeno-associado) e sistemas baseados em lipídio (lipídios úteis para transferência lipídio-mediada do gene são DOTMA, DOPE e DC-Chol, por exemplo). Em algumas situações, é desejável proporcionar a fonte de ácido nucleico com um agente que objeti-va as células alvo, tal como um anticorpo específico para uma proteína na membrana celular ou a célula alvo, um ligante para um receptor sobre a célula alvo, etc. Onde lipossomas são empregados, proteínas as quais se li-gam a uma proteína na membrana da superfície celular associada à endocitose podem ser usadas para objetivação e/ou facilitar a captação, por exemplo, proteínas de capsídeo ou fragmentos das mesmas trópicas para um tipo de célula em particular, anticorpos para proteínas as quais sofrem internali-zação em ciclicização e proteínas que objetivam a localização intracelular e intensificam a meia-vida intracelular. A técnica de endocitose receptor-mediada é descrita, por exemplo, por Wu e colaboradores, *J. Biol. Chem.*

262: 4429-4432 (1987); e Wagner e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). Para revisão de marcação de gene e protocolos de terapia genética presentemente conhecidos veja Anderson e colaboradores, *Science* 256: 808-813 (1992). Veja também WO 93/25673 e referências citadas no mesmo.

VI. Depósito de materiais

As linhagens de célula de hibridoma a seguir foram depositadas na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EUA (ATCC):

Designação de anticorpo	ATCC Nº.	Data de depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de Outubro de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de Outubro de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de Maio de 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de Abril de 1999

Esses depósitos foram feitos sob as condições do Tratado de Budapeste sob o International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations (Tratado de Budapeste). Isso assegura manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos a partir da data de depósito. Os depósitos serão tornados disponíveis pela ATCC sob os termos do Tratado de Budapeste e estão sujeitos a uma concordância entre a Genentech, Inc. e a ATCC, o que assegura que todas as restrições impostas pelo depositário sobre a disponibilidade ao público do material depositado serão irrevogavelmente removidas quando de emissão da patente U.S. pertinente, assegura disponibilidade permanente e irrestrita da prole da cultura do depósito ao público quando de emissão da patente U.S. pertinente ou quando de depósito em aberto ao público de qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeiro àqueles determinados pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks como sendo intitulada ao mesmo de acordo com 35 USC § 122 e as normas do Comissário pertinentes ao mesmo (incluindo 37 CFR § 1.14 com referência particular a 886 OG 638).

Outros detalhes da invenção são ilustrados pelos Exemplos não limitativos a seguir. As divulgações de todas as citações na especificação

são expressamente incorporadas aqui por referência.

EXEMPLO 1

ANÁLISE DE BIOMARCADOR CLÍNICO NO SORO EM PACIENTES COM CÂNCER OVARIANO TRATADO COM PERTUZUMAB

5 Design de Estudo

Um estudo de Fase II, rótulo aberto, ramificação única, multicentro foi realizado para avaliar o efeito de ativação de HER2 tumor-baseada da eficácia do rhuMAb 2C4 (pertuzumab) em indivíduos com câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

10 No Grupo 1 do experimento, 65 indivíduos com câncer ovariano avançado que eram resistentes a ou onde recorrência tinha havido, antes de quimioterapia, foram arrolados e receberam 420 mg por ciclo de rhuMAb (pertuzumab). Desses, 61 indivíduos foram tratados, 4 indivíduos saíram do estudo e não receberam qualquer tratamento com pertuzumab.

15 Os indivíduos que foram arrolados no Grupo 1 e preenchiam os critérios de elegibilidade, sofreram uma biópsia de tecido do tumor ou aspiração de células tumorígenas de fluido ascítico. Esse tecido foi analisado com relação à fosforilação de HER2 através de ELISA, medindo quantitativamente o HER2 fosforilado e HER2 total nas amostras.

20 Pertuzumab foi fornecido como uma formulação para uso único contendo 25 mg/mL de rhuMAb 2C4 formulado em L-histidina a 10 mM (pH de 6,0), sacarose a 240 mM e polisorbato 20 a 0,02%. Cada frasco de 10-15 cc continha cerca de 175 mg de rhuMAb 2C4 (7,0 mL/frasco). Quando de receita, os frascos foram refrigerados a 2°C - 8°C até uso. Em virtude do fato
25 de a formulação não conter um conservante, instrução foi fornecida para perfurar a vedação do frasco apenas uma vez. Qualquer solução restante foi descartada. A solução de rhuMAb 2C4 para infusão diluída em sacos de polietileno de PVC e poliolefina de não-PVC contendo Cloreto de Sódio para Injeção a 0,9%, USP, foi deixado armazenado a 2°C - 8°C durante 24 horas
30 antes de uso.

Pertuzumab foi administrado como uma infusão IV a cada 3 semanas durante até um ano (17 ciclos) para indivíduos que não mostraram

evidência de doença progressiva. Os indivíduos decidiram por uma dose de carregamento de 840 mg (Ciclo 1), seguido por 420 mg no Ciclo 2 e depois.

Após arrolamento no Grupo 1 ter terminado, arrolamento no Grupo 2 começou. Os indivíduos no Grupo 2 que preenchiam os critérios de elegibilidade receberam 1050 mg de pertuzumab administrado como uma
 5 infusão IV a cada 3 semanas durante até um ano (17 ciclos). Os indivíduos no Grupo 2 (o qual está em andamento) não sofreram uma biópsia do tecido tumorigeno ou aspiração de células tumorígenas de fluidos de ascite.

A resposta foi avaliada após 6 semanas, 3 meses e a cada 3
 10 meses depois. Uma resposta adicional é avaliada a 18 semanas (4,5 meses) para indivíduos no Grupo 2 apenas.

Doença mensurável foi avaliada usando o Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) (veja, por exemplo, Therasse e colaboradores, *J. Nat. Câncer Inst.* 92(3): 205-216 (2000)), através de avaliação clínica
 15 e exploração por CT ou equivalente. A resposta para indivíduos com doença avaliável, mas não mensurável, foi avaliada de acordo com alterações na CA-125 e evidência clínica e radiológica da doença.

Endpoint de eficácia primários

A melhor resposta global a qualquer momento durante o estudo
 20 após início de tratamento com pertuzumab, conforme determinado através de avaliação do investigador usando RECIST ou através de alterações na CA-125, após início de tratamento com pertuzumab.

Endpoints de eficácia secundários

Duração de resposta,
 25 Tempo de sobrevivência (sobrevivência global, OS) e
 Percentual de indivíduos sem progressão da doença a 3, 6 e 12 meses (sobrevivência sem doença, DFS).

A progressão da doença foi definida como doença progressiva documentada ou morte, o que ocorresse primeiro.

30 O tempo para progressão da doença (TTDP) foi definido como o tempo do primeiro dia de tratamento com o fármaco de estudo (Dia 1) até o momento de progressão documentada da doença ou morte.

A duração de sobrevivência foi definida como o tempo do Dia 1 até o momento da morte.

A duração de resposta foi definida como o tempo a partir da resposta completa ou parcial inicial até o momento de progressão da doença ou morte.

O intervalo de confiança de 95% exato foi construído para o percentual de indivíduos sem progressão após 3, 6 e 12 meses no estudo.

O tempo médio para progressão da doença e duração de sobrevivência foi calculado usando métodos de sobrevivência de Kaplan-Meier.

Avaliação exploratória de marcadores biológicos foi incorporada nesse experimento. A finalidade dessa avaliação foi encontrar um ou mais marcadores biológicos pré-tratamento que pudessem prever quais indivíduos responderiam ou não ao tratamento com pertuzumab ou identificar um ou mais marcadores biológicos pós-terapêuticos que poderiam atuar como um biomarcador de atividade do pertuzumab. Em particular, avaliação de marcadores biológicos permite identificação de uma população de pacientes que provavelmente se beneficiará especialmente de tratamento com pertuzumab, conforme medido através de um ou mais endpoints significativos, tais como sobrevivência global (OS) ou sobrevivência sem doença (DFS).

Assim, caracterização de perfil de gene foi realizada sobre tecido epitelial ovariano normal e tumores epiteliais ovarianos. Amostras de tumor ovariano obtidas nesse estudo foram submetidas à caracterização de perfil de expressão de RNA de forma a explorar a relação entre expressão de RNA e resposta ao pertuzumab.

Medição de biomarcadores no soro

Soro sanguíneo de pacientes com câncer de mama metastático expressando HER2 tratados com pertuzumab foi avaliado com relação aos níveis de ampiregulina, EGF, TGF-alfa e HER2 protegido (HER2 ECD), conforme descrito abaixo.

Kits usados para avaliação dos biomarcadores no soro:

Marcador	Ensaio	Distribuição
HER2-ECD	Bayer HER-2/heu ELISA, Cat.#: EL501	DakoCytomation N.V./S.A. Interleuvenlaan 12B, B-3001 Heverlee
Ampiregulina	DuoSet ELISA Development System Human Amphiregulin, Cat. #: DY262	R&D Systems Ltda., 19 Barton Lane, Abingdon OX 14 3NB, Reino Unido
EGF	Quantikine human EGF ELISA kit, Cat. #: DEG00	R&D Systems Ltda., 19 Barton Lane, Abingdon OX14 3NB, Reino Unido
TGF-alfa	Quantikine® Human TGF-alpha Immunoassay, Cat. #: DT- GA00	R&D Systems Ltda., 19 Barton Lane, Abingdon OX14 3NB, Reino Unido

Protocolos**HER2-ECP**

ELISA de HER2-ECD foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

5 Ampiregulina

Reagentes, diluições padrões e amostras foram preparados seguindo as instruções do fabricante. Tiras de microlâmina de IgG anti-camundongo de cabra EvenCoat (R&D, Cat. # CP002; não fornecidas com o kit) foram presas à lâmina para criar uma lâmina de ELISA. 100 µl de anticorpo de captura diluído (fornecido com o kit; 1:180 em PBS) foram adicionados a cada cavidade e as cavidades foram incubadas em temperatura ambiente durante uma hora.

Cada cavidade foi aspirada e lavada e o processo foi repetido três vezes durante um total de quatro lavagens. As cavidades foram lavadas através de enchimento de cada cavidade com 400 µl de Tampão de Lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS) usando um distribuidor de derivação e subsequente aspiração. Após a última lavagem, qualquer Tampão de Lavagem restante foi removido através de aspiração. A lâmina foi, então, invertida e seca contra papel toalha limpo.

Diluição padrão de 100 µl ou amostra diluída (veja abaixo) por cavidade foi adicionada. A ponta foi trocada após cada etapa de pipetamento. A lâmina foi coberta com a fita adesiva (fornecida com o kit) e incubada durante 2 horas em temperatura ambiente em uma plataforma giratória. Após o que, as etapas de aspiração e lavagem foram repetidas conforme descrito acima.

As amostras aspiradas e soluções de lavagem foram tratadas com desinfetante de laboratório. 100 µl de Anticorpo de Detecção (fornecido com o kit) foram adicionados, diluídos a 1:180 em Diluente de Reagente (BSA a 1%; Roth; Fração V de Albumina, Cat. # T844.2 em PBS) por cavidade e a lâmina foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente. Após o que, as etapas de aspiração e lavagem foram repetidas conforme descrito acima.

100 µl de diluição de trabalho da Estreptavidina-HRP foram adicionados a cada cavidade (fornecido com o kit; diluição a 1:200 em diluente de reagente) e as cavidades foram cobertas com uma nova fita adesiva e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente. As etapas de aspiração e lavagem foram repetidas conforme descrito acima.

100 µl de solução de substrato (R&D, Cat. # DY999; não fornecida com o kit) foram adicionados a cada cavidade e as cavidades foram incubadas em temperatura ambiente durante 20 minutos, sob proteção contra a luz.

50 µl de solução de término (H_2SO_4 a 1,5 M (Schwefelsaure re-inst, Merck, Cat. # 713)) foram adicionados a cada cavidade, seguido por mistura cuidadosa. A densidade óptica de cada cavidade foi medida imediatamente, usando um leitor para microlâmina ajustado a 450 nm.

Curva padrão de ampiregulina

Uma solução de estoque de ampiregulina a 40 ng/ml foi preparada em BSA a 1% em PBS, transformada em alíquota e armazenada a -80°C. Soluções de ampiregulina em BSA a 20% em PBS não eram estáveis além de 2 semanas e, portanto, não foram usadas. A partir da solução de estoque de ampiregulina em alíquota, a curva padrão de ampiregulina foi preparada recentemente em BSA a 20% em PBS antes de cada experimento. A maior concentração foi de 1000 pg/ml (diluição a 1:40 da solução de estoque de ampiregulina). Os padrões fornecidos com o kit ELISA produziram uma curva padrão linear. Análise baseada em excel das curvas permitiu a determinação de equações de curva para cada ELISA.

Amostras de ampiregulina

Quando as amostras foram diluídas a 1:1 em diluente de reagente, todas as amostras estavam dentro da faixa linear do ELISA. Cada amostra foi medida em duplicata. Dependendo da qualidade dos dados e de quantidades suficientes de soro, as determinações foram repetidas em experimentos subsequentes se necessário.

EGF

Reagentes, diluições padrões e amostras foram preparados se-

guindo as instruções do fabricante. Tiras de lâmina de microtitulação revestidas com anticorpo (fornecidas com o kit) foram removidas da estrutura para criar uma lâmina para ELISA. Após determinar o número requerido de cavidades e o layout de lâmina, 50 µl de diluente de ensaio RD1 (fornecido com o kit) foram adicionados a cada cavidade. Diluição padrão de 200 µl ou amostra diluída (por exemplo, 1:20 em Calibrador Diluent RD6H) por cavidade foi, então, adicionada. A ponta foi trocada após cada etapa de pipeteamento. A lâmina foi coberta com a fita adesiva (fornecida com o kit) e incubada em temperatura ambiente durante duas horas sobre uma plataforma giratória.

5 Cada cavidade foi aspirada e lavada, repetindo o processo três vezes durante um total de quatro lavagens. Lavagem foi realizada enchendo cada cavidade com 400 µl de tampão de lavagem (fornecido com o kit) usando uma distribuição de derivação e subsequente aspiração. Após a última lavagem, qualquer tampão de lavagem restante foi removido através de aspiração. A lâmina foi, então, invertida e seca contra papel toalha limpo.

15 As amostras aspiradas e soluções de lavagem foram tratadas com desinfetante de laboratório e 200 µl de conjugado (fornecido com o kit) foram adicionados a cada cavidade. A lâmina foi, então, coberta com uma nova fita adesiva e incubada em temperatura ambiente durante duas horas.

20 As etapas de aspiração e lavagem foram repetidas conforme descrito anteriormente.

200 µl de solução de substrato (fornecida com o kit) foram adicionados a cada cavidade, seguido por incubação durante 20 minutos em temperatura ambiente, sob proteção contra a luz. 50 µl de solução de término (fornecida com o kit) foram adicionados a cada cavidade, seguido por mistura cuidadosa.

A densidade óptica de cada cavidade foi determinada dentro de 30 minutos, usando um leitor para microlâmina ajustado a 450 nm.

Curva padrão de EGF

30 Os padrões fornecidos com o kit ELISA produziram uma curva padrão linear. Também, concentrações muito pequenas mostraram resultados detectáveis.

Amostras de EFG

Um total de quatro ensaios com as amostras foi realizado. Cada amostra foi medida 2-5 vezes, o número de determinações sendo dependente da qualidade dos resultados (média $\pm$ SD) e da viabilidade de quantidades
5 suficientes de soro.

Quando as amostras foram diluídas a 1:20 em Calibrator Diluent RD6H, todas as amostras estavam dentro da faixa linear do ELISA.

TGF-alfa

Reagentes, diluições padrões e amostras foram preparados seguindo as instruções do fabricante. Tiras de lâmina de microtitulação revestidas com anticorpo em excesso (fornecidas com o kit) foram removidas da estrutura para criar uma lâmina para ELISA. Após determinar o número requerido de cavidades e o layout de lâmina, 100 μ l de diluente de ensaio RD1W (fornecido com o kit) foram adicionados a cada cavidade, seguido
10 pela adição de diluição padrão de 50 μ l ou amostra diluída por cavidade. A ponta foi trocada após cada etapa de pipeteamento.

A lâmina foi coberta com a fita adesiva fornecida com o kit e incubada em temperatura ambiente durante duas horas sobre uma plataforma giratória.

Cada cavidade foi aspirada e lavada, repetindo o processo três vezes durante um total de quatro lavagens. Na etapa de lavagem seguinte, cada cavidade foi enchida com 400 μ l de tampão de lavagem (fornecido com o kit) usando um distribuição de derivação, seguido por aspiração. Após a última lavagem, qualquer tampão de lavagem restante foi removido através
20 de aspiração e a lâmina foi, então, invertida e seca contra papel toalha limpo.

As amostras aspiradas e soluções de lavagem foram tratadas com desinfetante de laboratório.

200 μ l de conjugado de TGF-alfa (fornecido com o kit) foram adicionados a cada cavidade e a lâmina foi, então, coberta com uma nova fita adesiva e incubada em temperatura ambiente durante duas horas.
30

As etapas de aspiração e lavagem foram repetidas conforme

descrito anteriormente. Após o que, 200 µl de solução de substrato (fornecida com o kit) foram adicionados a cada cavidade e a lâmina foi incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos, sob proteção contra a luz.

5 50 µl de solução de término (fornecida com o kit) foram adicionados a cada cavidade com mistura cuidadosa.

A densidade óptica de cada cavidade foi determinada dentro de 30 minutos, usando um leitor para microlâmina ajustado a 450 nm.

Curva padrão de TGF-alfa

10 Os padrões fornecidos com o kit ELISA produziram uma curva padrão linear. Também, concentrações muito pequenas mostraram resultados detectáveis.

Amostras de TGF-alfa

Um total de quatro ensaios com as amostras foi realizado. Cada amostra foi medida em 2-4 ensaios independentes.

15 **Resultados**

A correlação entre os vários marcadores foi testada usando o teste de coeficiente de correlação da magnitude de classificação de Spearman e os resultados são mostrados na figura 9. De acordo com esse teste, a correlação é classificada entre -1 (para a melhor correlação negativa) e +1
20 (para a melhor correlação positiva). Conforme mostrado na figura 9, os níveis no soro de HER2, TGF-alfa, ampiegulina e EGF mostraram muito pouca correlação, o que confirma que esses genes atuam como marcadores independentes. A figura 10 mostra a correlação dos marcadores testados com co-variáveis clínicas, incluindo escores de ECOG (BECOG = escore de
25 ECOG de linha de base), antes de quimioterapia (PRITCN), carga do tumor e duração de diagnóstico (DIAGDUR, isto é, quanto tempo o indivíduo teve câncer antes de diagnóstico). Menores escores de ECOG (0 e 1) indicam que a doença é menos grave e o paciente está em uma condição relativamente boa. Maiores escores de ECOG (> 1) indicam gravidade crescente
30 dos escores 2 a 4. Conforme mostrado na figura 10, não houve correlação significativa entre os níveis no soro dos marcadores testados e a gravidade da doença. Por outro lado, os níveis no soro de ampiegulina e EGF eram

significativamente maiores em indivíduos que foram submetidos a mais de 4 tratamentos prévios de quimioterapia.

As curvas de sobrevivência foram plotadas de acordo com o método de Kaplan-Meier. Essas curvas foram comparadas entre subgrupos de
5 pacientes usando o teste de log-classificação, de forma a definir os cutoffs que proporcionam a melhor discriminação ao definir a probabilidade de sobrevivência sem progressão (PFS) e a sobrevivência global (OS). Os resultados para PFS e OS são mostrados nas figuras 11 e 12, respectivamente. Conforme mostrado na figura 11, o ponto de limite de corte em termos de
10 PFS é particularmente claro para os níveis de EGF (correlação positiva clara).

A distribuição de pacientes de acordo com os cutoffs, usando a PFS, é mostrada na figura 13. Conforme mostrado na figura, os cutoffs determinados funcionam bem para os marcadores individuais RGF-alfa e EGF
15 e são particularmente úteis como uma função desse aos marcadores combinados.

Curvas de sobrevivência foram calculadas através de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. O efeito dos níveis de HER2 sobre a PFS e OS é ilustrado pelas plotagens de Kaplan-Meier na figura 14. O efeito dos
20 níveis de TGF-alfa sobre a PFS e OS é ilustrado pelas plotagens Kaplan-Meier na figura 15. O efeito dos níveis de EGF sobre a PFS e OS é ilustrado pelas plotagens Kaplan-Meier na figura 16.

EXEMPLO 2

ANÁLISE DE BIOMARCADOR NO SORO EM PACIENTES COM CÂNCER **OVARIANO, PERITONEAL PRIMÁRIO OU DO TUBO FALOPIANO TRA-** **TADOS COM PERTUZUMAB E QUIMIOTERAPIA**

Design de estudo

Um experimento de Fase II, aleatório, placebo-controlado, duplamente cego, multicentro é realizado de forma a fazer uma avaliação preliminar da eficácia do pertuzumab (rhuMAb 2C4) em combinação com o agente quimioterapêutico gemcitabina com placebo em indivíduos com câncer
30 ovariano, peritoneal primário ou do tubo falopiano resistente à platina, con-

forme medido através da sobrevivência sem progressão (PFS) para todos os indivíduos. Outro objetivo do experimento é avaliar a segurança e tolerabilidade do pertuzumab em combinação com gemcitabina com relação à gemcitabina em combinação com placebo em indivíduos com câncer ovariano, peritoneal primário ou do tubo falopiano resistente à platina.

Indivíduos que experimentaram progressão da doença em ou dentro de 6 meses ao receber regime de quimioterapia baseado em platina administrado para doença avançada são elegíveis para esse estudo. Não mais do que um regime prévio para doença resistente à platina é permitido.

Os indivíduos são aleatoriamente distribuídos, em uma proporção de 1:1, ao Grupo de tratamento 1 (gemcitabina + pertuzumab) ou Grupo 2 (gemcitabina + placebo). Gemcitabina é administrada nos Dias 1 e 8 de um ciclo de 21 dias. Gemcitabina é infundida durante 30 minutos ($\pm$ 5 minutos) em uma dose inicial de 800 mg/m^2 . fármaco de estudo às cegas (gemcitabina ou placebo) é administrado em uma dose de carregamento inicial de 840 mg (Ciclo 1), seguido por 420 mg para o Ciclo 2 e depois. O placebo equivalente é administrado em um volume equivalente à quantidade de fluido de suspensão requerida para preparar a dose de pertuzumab.

Indivíduos sem doença progressiva são deixados receber tratamento com gemcitabina mais fármaco de estudo às cegas durante até 17 ciclos nesse estudo. A resposta é avaliada a cada 6 semanas para os primeiros oito ciclos e cerca de a cada 3 meses depois do final dos Ciclos 2, 4, 6, 8, 12 e 17). Doença mensurável é avaliada usando o Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) através de avaliação clínica e exploração por tomografia computadorizada ou equivalente. A resposta para indivíduos com doença avaliável é analisado de acordo com alterações na CA-125 e evidência clínica radiológica da doença.

Pacientes que forneceram consentimento adicional tinham a opção de fornecer amostras de soro e plasma para estudos exploratórios de marcador biológico. Esses estudos incluem avaliação de mutações potenciais na família do gene do receptor HER, imunohistoquímica para proteínas da família HER e proteínas a jusante associadas à sinalização ao HER, en-

- saio de dimerização ou ensaios de proximidade para avaliar a ativação de HER2 e determinação da expressão dos níveis de genes específicos que são identificados como estando associados à sinalização ao HER2 ou podem servir como marcadores ou prognósticos de resposta. Os estudos incluem análise de expressão de gene e técnicas proteômicas.

Medidas de resultados primários

Sobrevivência sem progressão, conforme determinado através de avaliação do investigador usando RECIST ou através de alterações de CA-125 (indivíduos com doença não mensurável apenas).

Medidas de resultados secundários

Taxa de resposta objetiva (resposta parcial ou resposta completa), duração de resposta, tempo de sobrevivência e tempo sem progressão a 4 meses.

Endpoint primário

- O endpoint de eficácia primário é a sobrevivência sem progressão, definida como o tempo de distribuição aleatória até progressão documentada da doença ou morte por qualquer causa quando de estudo, o que ocorrer primeiro. A progressão da doença é avaliada pelo investigador de acordo com o RECIST ou alterações na CA-125 para indivíduos com doença mensurável e não mensurável, respectivamente. Morte quando de estudo é definida como morte por qualquer causa dentro de 30 dias da última dose do medicamento de estudo.

- Um censo dos dados para indivíduos sem progressão da doença ou morte é feito no momento de última avaliação de tumor ou CA-125 (ou, se nenhuma avaliação de tumor ou CA-125 é feita após a visita de linha de base, no momento de distribuição aleatória mais 1 dia).

- Métodos de Kaplan-Meier são usados para estimar a sobrevivência sem progressão média para cada grupo de tratamento. Modelos de perigo proporcional de Cox, usando dois modelos (com e sem os fatores de estratificação de distribuição aleatória capacidade de medição do estado da doença pelo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) e número de regimes anteriores para doença resistente à platina são usados para estimar a

proporção de perigo (isto é, a magnitude de efeito de tratamento em um intervalo de confiança de 95%). O modelo estratificado produz o intervalo de confiança primário. O teste de log-classificação, estratificado através dos fatores de estratificação de distribuição aleatória (estado ECOG, capacidade de medição da doença e número de regimes prévios para doença resistente à platina) é usado para realizar testagem teórica exploratória para avaliar a diferença entre os grupos de tratamento. O teste de log-classificação não estratificado também é fornecido. Análises distintas de sobrevivência sem progressão também são apresentadas para indivíduos com doença mensurável e para indivíduos com doença não mensurável; em virtude do fato de o número de indivíduos em cada grupo ser pequeno, o teste de log-classificação exploratório não pode ser realizado para ambos os grupos. Análises distintas de sobrevivência sem progressão são também conduzidas para indivíduos que não têm qualquer regime prévio para doença resistente à platina e para indivíduos que têm um regime prévio para doença resistente à platina; testes de log-classificação exploratórios são realizados para ambos os grupos.

Endpoints secundários

Resposta objetiva

A resposta objetiva é definida como uma resposta completa ou parcial determinada em duas ocasiões consecutivas > 4 semanas de distância. Indivíduos sem um tumor pós-linha de base ou avaliação de CA-125 são considerados não respondedores. Uma estimativa da taxa de resposta objetiva e intervalos de confiança de 95% (Blyth-Still-Casella) é calculada para cada grupo de tratamento. Intervalos de confiança para a diferença na taxa de resposta do tumor são calculados (Santer e Snell, *J. Am. Stat. Assoc.* 75: 386-94 (1980); Berger e Boos, *J. Am. Stat. Assoc.* 89: 4087-91 (1990)). Teste exato de Fisher é usado para realizar testagem teórica exploratória para explorar a diferença entre os grupos de tratamento.

Duração de resposta objetiva

Para indivíduos com uma resposta objetiva, a duração da resposta objetiva é definida com o tempo da resposta inicial para progressão da

doença ou morte por qualquer causa quando de estudo.

Métodos para manipular a realização de censo e para análise são os mesmos conforme descrito para a sobrevivência sem progressão.

Tempo sem progressão a 4 meses

- 5 A proporção de indivíduos sem progressão a 4 meses para cada grupo de tratamento é estimada a partir da curva de Kaplan-Meier para sobrevivência sem progressão. Uma estimativa da taxa sem progressão e intervalos de confiança de 95% (Greenwood, *Rep. Pub. Health. Med. Subjects* 33: 1-26 (1926)) é calculada para cada grupo de tratamento. Um Z-teste com
10 dois lados é usado para realizar testagem teórica exploratória para avaliar a diferença entre os grupos de tratamento.

Duração de sobrevivência

- Duração de sobrevivência é definida como o tempo de distribuição aleatória até morte por qualquer causa. Todas as mortes são incluídas,
15 quer elas ocorram quando de estudo ou após descontinuação de tratamento. Para indivíduos que não morreram, o censo da duração de sobrevivência é feito na data do último contato. Os métodos de análise são os mesmos conforme descrito para sobrevivência sem progressão.

- O estudo está em andamento, mas espera-se que, baseado em
20 análise de expressão de gene de amostras do soro ou plasma, pacientes que produzem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) e/ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) mostrem uma sobrevivência prolongada (especialmente sobrevivência sem progressão) em resposta ao tratamento com pertuzumab e gemcitabina.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> GENENTECH, INC.
 F. HOFFMANN-LA ROCHE, AG
 LUKAS C. AMLER
 NUSRAT RABBEE
 ANDREAS STRAUSS
 JOACHIM MOECKS
 <120> PROLONGAMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER COM NÍVEIS
 ELEVADOS DE EGF OU TGF-ALFA
 <130> 39766-0198 PCT
 <140> A SER ATRIBUÍDO
 <141> COM O MESMO
 <150> US 60/811,234
 <151> 2006-06-05
 <160> 22
 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105
 Ile Lys
 <210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
 80 85 90

```

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
          95                      100                      105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
          110                      115

```

```

<210>    3
<211>   107
<212>   PRT
<213>   Sequência artificial

```

```

<220>
<223>   Sequência é sintetizada

```

```

<400>    3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5                      10                      15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
          20                      25                      30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          35                      40                      45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
          50                      55                      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          65                      70                      75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          80                      85                      90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
          95                      100                      105
Ile Lys

```

```

<210>    4
<211>   119
<212>   PRT
<213>   Sequência artificial

```

```

<220>
<223>   Sequência é sintetizada

```

```

<400>    4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1          5                      10                      15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
          20                      25                      30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          35                      40                      45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
          50                      55                      60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
          65                      70                      75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
          80                      85                      90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
          95                      100                      105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          110                      115

```

```

<210>    5
<211>   107
<212>   PRT
<213>   Sequência artificial

```

```

<220>
<223>   Sequência é sintetizada

```

```

<400>      5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1              5              10              15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
              20              25              30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
              35              40              45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
              50              55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
              65              70              75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
              80              85              90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
              95              100             105
Ile Lys

```

```

<210>      6
<211>     119
<212>     PRT
<213>     Sequência artificial

<220>
<223>     Sequência é sintetizada

```

```

<400>      6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1              5              10              15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
              20              25              30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
              35              40              45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
              50              55              60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
              65              70              75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
              80              85              90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
              95              100             105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
              110             115

```

```

<210>      7
<211>     10
<212>     PRT
<213>     Sequência artificial

```

```

<220>
<223>     Sequência de anticorpo humanizado

```

```

<220>
<221>     VARIANTE
<222>     10
<223>     Xaa é, de preferência, Asp ou Ser

```

```

<400>      7
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 1              5              10

```

```

<210>      8
<211>     17
<212>     PRT
<213>     Sequência artificial

```

<220>
 <223> Sequência de anticorpo humanizado

 <400> 8
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência de anticorpo humanizado

 <400> 9
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência de anticorpo humanizado

 <400> 10
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência de anticorpo humanizado

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa é de preferência, Arg ou Leu

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa é de preferência, Tyr ou Glu

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa é de preferência, Thr ou Ser

 <400> 11
 Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de anticorpo humanizado

<400> 12
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência é sintetizada

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência é sintetizada

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	
				95					100					105	
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
				110					115					120	
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
				125					130					135	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	
				140					145					150	
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
				155					160					165	
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
				170					175					180	
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				185					190					195	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
				200					205					210	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
				215					220					225	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
				230					235					240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
				275					280					285	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
				290					295					300	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				305					310					315	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
				320					325					330	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
				335					340					345	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
				350					355					360	
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				365					370					375	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
				380					385					390	
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
				395					400					405	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				410					415					420	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
				425					430					435	
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
				440					445						

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência é sintetizada

<400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

```

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      65      70      75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      80      85      90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
      95     100     105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110     115     120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
     125     130     135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
     140     145     150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
     155     160     165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
     170     175     180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
     185     190     195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
     200     205     210
Arg Gly Glu Cys

```

```

<210>    16
<211>    449
<212>    PRT
<213>    Sequência artificial

```

```

<220>
<223>    Sequência é sintetizada

```

```

<400>    16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
  1      5      10      15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
  20      25      30
Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  35      40      45
Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
  50      55      60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
  65      70      75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
  80      85      90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
  95     100     105
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  110     115     120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
  125     130     135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
  140     145     150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
  155     160     165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
  170     175     180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
  185     190     195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
  200     205     210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
  215     220     225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
  230     235     240

```


Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				275					280					285
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
				290					295					300
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				305					310					315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
				320					325					330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				335					340					345
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
				350					355					360
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
				365					370					375
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				380					385					390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				395					400					405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				410					415					420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				425					430					435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
				440					445					

<210> 17
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência é sintetizada

<400> 17

Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln
				20					25					30
Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
				35					40					45
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly
				50					55					60
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
				65					70					75
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				80					85					90
Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				95					100					105
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
				110					115					120
Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
				125					130					135
Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
				140					145					150
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
				155					160					165
Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				170					175					180
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				185					190					195
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
				200					205					210

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 18
<211> 449
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência é sintetizada

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95 100 105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
125 130 135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
140 145 150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
155 160 165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
170 175 180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
185 190 195
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
200 205 210
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
215 220 225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
320 325 330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
335 340 345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
350 355 360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
365 370 375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
380 385 390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
395 400 405

```

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      410                      415                      420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      425                      430                      435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      440                      445

```

```

<210>    19
<211>    195
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens

```

```

<400>    19
Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
  1      5      10      15
Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
      20      25      30
Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
      35      40      45
Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
      50      55      60
Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
      65      70      75
Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
      80      85      90
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
      95     100     105
Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
     110     115     120
Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
     125     130     135
Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
     140     145     150
Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
     155     160     165
Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
     170     175     180
Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
     185     190     195

```

```

<210>    20
<211>    124
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens

```

```

<400>    20
Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
  1      5      10      15
Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
      20      25      30
Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
      35      40      45
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp
      50      55      60
Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
      65      70      75
Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
      80      85      90
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
      95     100     105
Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
     110     115     120
Cys Ala Arg Val

```

<210> 21
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
 20 25 30
 Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
 35 40 45
 Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
 50 55 60
 Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 65 70 75
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
 80 85 90
 Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 95 100 105
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
 110 115 120
 Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 125 130 135
 Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
 140 145 150
 Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
 155 160 165
 Glu Gly Leu Ala

<210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
 20 25 30
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 35 40 45
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 50 55 60
 Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
 65 70 75
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
 80 85 90
 Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
 95 100 105
 Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 110 115 120
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
 125 130 135
 Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 140

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer compreendendo administração de um inibidor de dimerização de HER ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do
5 paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) e o câncer é selecionado do grupo consistindo de câncer ovariano, câncer peritoneal e câncer do tubo falopiano.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é
10 determinado como produzindo um nível elevado de EGF.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que se descobriu que há um nível elevado de EGF no soro do paciente.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de TGF-alfa.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que se descobriu que há um nível elevado de TGF-alfa no soro do paciente.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de dimerização de HER é inibidor de dimerização de HER2.

20 7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de dimerização de HER inibe heterodimerização de HER.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER.

25 9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo se liga a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EGFR, HER2 e HER3.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo se liga a HER2.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo ao HER2 se liga ao Domínio II do domínio extracelular de HER2.

30 12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo se liga a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o anticorpo ao HER compreende as sequências de aminoácido de cadeia pesada variável e leve variável em SEQ ID NOs 3 e 4, respectivamente.

5 14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

15. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo naked.

16. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo intacto.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 8 em que o anticorpo ao HER é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

15 19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer ovariano resistente à platina.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer peritoneal primário ou do tubo de falópio.

20 21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o inibidor de dimerização de HER é administrado como um único agente anti-tumor.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, compreendendo administração de um agente terapêutico secundário ao paciente.

25 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo de agente quimioterapêutico, anticorpo ao HER, anticorpo dirigido contra um antígeno tumor-associado, composto anti-hormonal, cardioprotetor, citocina, fármaco EGFR-objetivado, agente anti-angiogênico, inibidor de quinase de tirosina, inibidor de COX, fármaco anti-inflamatório não esteroide, inibidor de farnesil transferase, anticorpo que se liga à proteína oncofetal CA 125, vacina de HER2, terapia de objetivação de HER, inibidor de Raf ou ras, doxorubicina lipossô-

30

mica, topotecan, taxano, inibidor duplo de quinase de tirosina, TLK286, EMD-7200, um medicamento que trata náusea, um medicamento que previne ou trata *rash* cutâneo ou terapia padrão para acne, um medicamento que trata ou previne diarreia, um medicamento para redução da temperatura corporal e um fator de crescimento hematopoiético.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que o segundo agente terapêutico é um agente quimioterapêutico.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o agente quimioterapêutico é um agente quimioterapêutico anti-metabólito.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o agente quimioterapêutico anti-metabólito é gemcitabina.

27. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o segundo agente terapêutico é trastuzumab, erlotinib ou bevacizumab.

28. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a sobrevivência de progressão livre (PFS) é prolongada.

29. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a sobrevivência global (OS) é prolongada.

30. Método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o paciente tem câncer ovariano.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, ou a reivindicação 31 em que o paciente tem câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, ainda compreendendo administração de um agente quimioterapêutico ao paciente.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o agente

quimioterapêutico é um agente quimioterapêutico anti-metabólito.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que o agente quimioterapêutico anti-metabólito é gemcitabina.

36. Método para prolongar a sobrevivência de progressão livre (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que o soro do paciente é determinado como tendo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) no mesmo.

37. Método para prolongar a sobrevivência de progressão livre (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que o soro do paciente é determinado como tendo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) no mesmo.

38. Método de acordo com a reivindicação 26 ou a reivindicação 37, em que o câncer é câncer ovariano.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o câncer ovariano é câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

40. Método de seleção de um paciente para tratamento com um inibidor de dimerização de HER compreendendo tratamento do paciente com o inibidor de dimerização de HER se o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

41. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a sobrevivência do paciente é prolongada com relação à sobrevivência do paciente que não produz um nível elevado de EGF ou TGF-alfa e recebe o mesmo tratamento.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a sobrevivência é sobrevivência global (OS).

43. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a sobrevivência é sobrevivência de progressão livre (PFS).

44. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o inibidor de dimerização de HER é um inibidor de dimerização de HER2.

45. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o inibidor de dimerização de HER inibe heterodimerização de HER.

5 46. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo se liga a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EGFR, HER2 e HER3.

10 48. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o anticorpo se liga a HER2.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que o anticorpo ao HER2 se liga ao Domínio II do domínio extracelular de HER2.

15 50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo se liga a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o anticorpo ao HER compreende as sequências de aminoácido de cadeia pesada variável e leve variável em SEQ ID NOs 3 e 4, respectivamente.

20 52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

53. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo naked.

25 54. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo intacto.

55. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno.

30 56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 55, ainda compreendendo tratamento do referido paciente com um agente quimioterapêutico.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o agente

quimioterapêutico é gemcitabina.

58. Kit compreendendo um inibidor de dimerização de HER e uma bula de embalagem ou rótulo indicando um uso benéfico para o inibidor de dimerização de HER se o paciente a ser tratado produz um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

59. Método como definido na reivindicação 58, em que o câncer é câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio.

60. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o uso benéfico é prolongamento de sobrevivência.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, em que a sobrevivência é sobrevivência de progressão livre.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 61, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo.

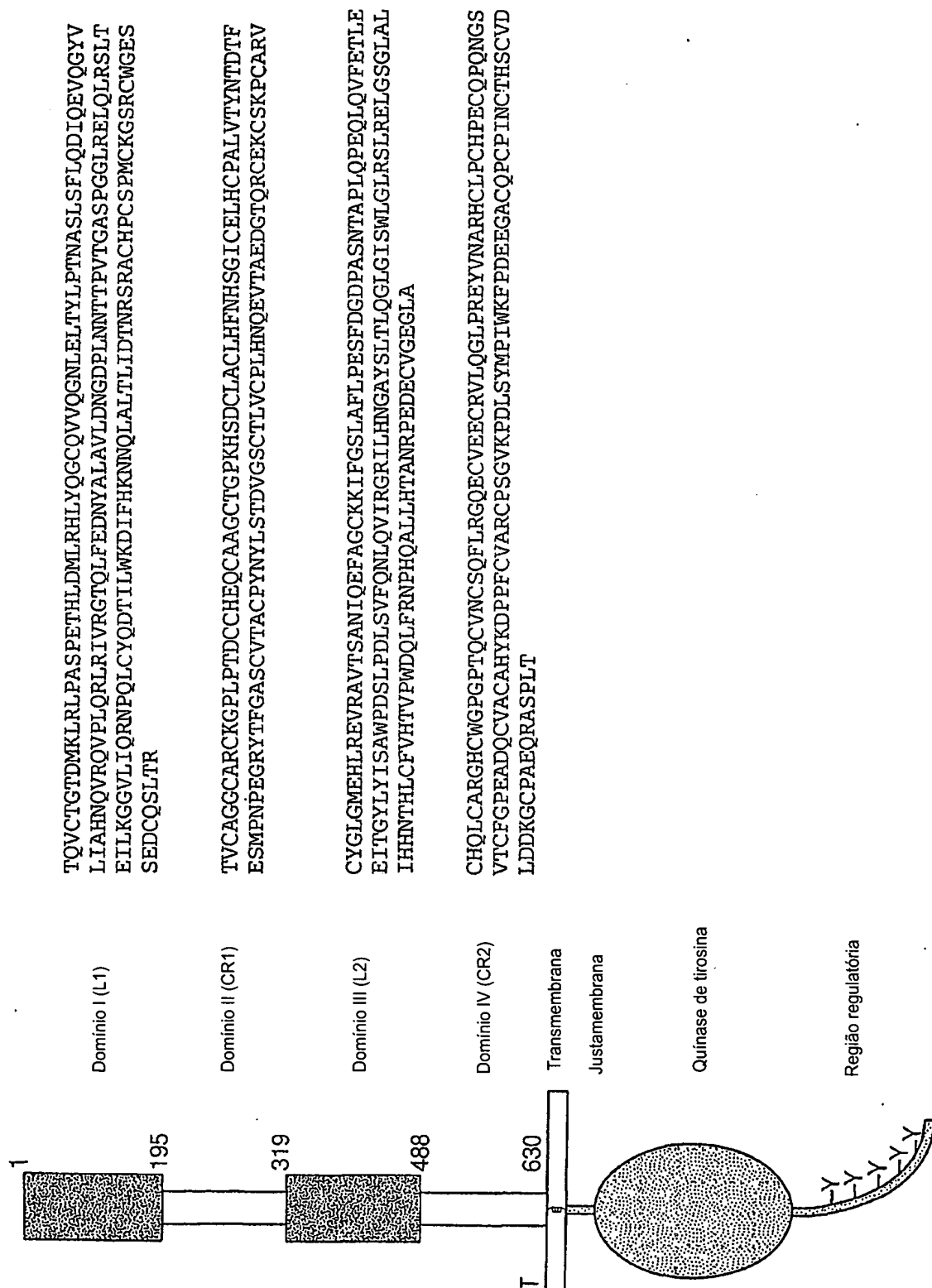
63. Método de acordo com a reivindicação 62, em que o anticorpo é um anticorpo ao HER2.

64. Método de acordo com a reivindicação 63 em que o anticorpo é pertuzumab.

65. Método para promover um inibidor de dimerização de HER para tratar pacientes que produzem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

66. Método de acordo com a reivindicação 65, em que a promoção é na forma de um material por escrito.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, em que a promoção é na forma de uma bula para embalagem.



TQVCTGDMKLRLLPASPEETHDMLRHL YQGCQV VQGNLELT YLP TNASLSFLQDIQEVQGYV
LIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLT
EILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTILIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGES
SEDCQSLTR

TVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVTAEDGTQRCCKSKPCARV

CYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLE
EITGYLYISAWPDSLPDLVSFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLAL
IHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLA

CHQLCARGHCWGPPTQC VNC SQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQPQNGS
VTCFGPEADQCVACAHYKDPPEFCVARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCHSCVD
LDDKGC PAEQRASPLT

FIG 1

Leve variável

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

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

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

FIG. 2A

Pesada variável

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTD YTMD]	WVKQS	
	** ** * * *** *		* *	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTD YTMD]	WVRQA	
			** * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSS YAMS]	WVRQA	

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

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

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

FIG. 2B

Sequência de aminoácido para cadeia leve do pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 3A

Sequência de aminoácido para cadeia pesada do pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
 70 80 90 100 110 120
 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGQGLTVTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 LYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 3B

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

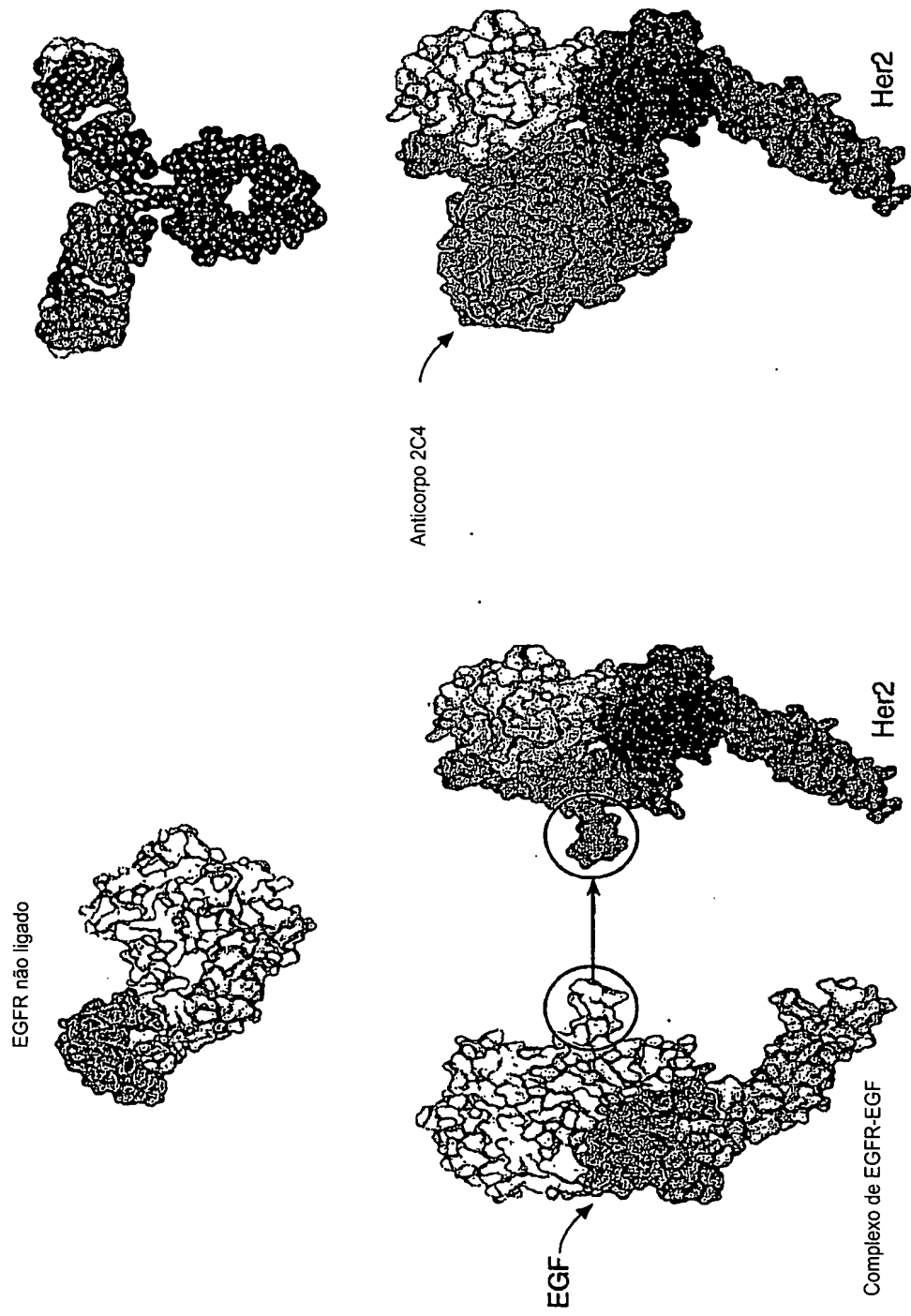
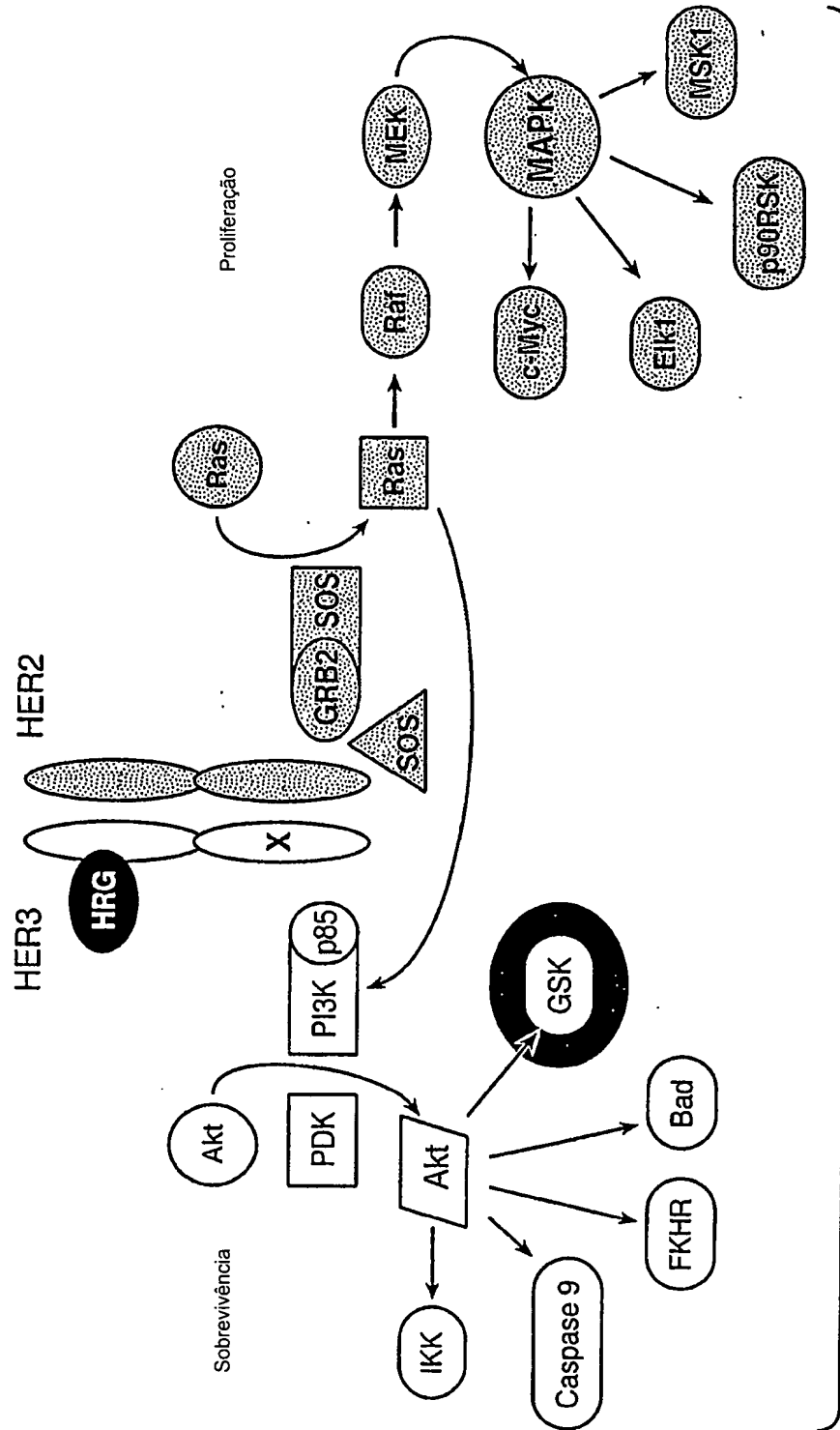


FIG. 4

Acoplamento de HER2/3 às vias de MAPK e Akt

**FIG. 5**

Trastuzumab Herceptin



- Se liga em IV próximo da JM
- Protege contra proteção do receptor
- Afeta moderadamente a sub-modulação do receptor
- Ligeiro efeito sobre o papel do HER2 como um co-receptor

Pertuzumab Omnitarg



- Se liga em II na interface de dimerização
- Não previne proteção do receptor
- Afeta moderadamente a sub-modulação do receptor
- Grande efeito sobre o papel do HER2 como um co-receptor

FIG. 6

Cadeia leve

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	45
46	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	90
91	H	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135	
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C												

FIG. 7A

Cadeia pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWVRQAPGKGL 45
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
 91 TAVYYCSRWG G DGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSS 135
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS 180
 181 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 226 THTCPPCPAP ELLGGPSPVFLFPKPKD TLMISRTP E VTCVVDVS 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS⁼⁼TYRVSVLTVLHQD 315
 316 WLN GK EYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDG 405
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNV FSCSVMH EALHNH Y TQKSLSLSPG 449

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217

FIG. 8A

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL 45
 46 EWVADVNPNSSGGSIYNNQRFFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSSLRAED 90
 91 TAVYYCARNNLGPSSFYFDYWGGQGTLVTVSSASTKGPSTVFPLAPSSK 135
 136 STSGGTAALGCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
 181 LYSLSSTVTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKKVDKKVEPKSCDKT 225
 226 HTCPPCPAPELLGGPSSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSH 270
 271 EDPEVKFNWYVDGVVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW 315
 316 LNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYITLPSSREEM 360
 361 TKNQVSLTCLVKGFYPSSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDGS 405
 406 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSKCSVMHREALHNHYTQKSSLSPGK 449

FIG. 8B

Tabela de correlação entre marcadores (correlação de Spearman)

	HER2	TGF- α	AMPH IREG	EGF
HER2	1	-.2	.11	-.18
TGF- α		1	.2	.26
AMPHI			1	.07
EGF				1

Fig.9

Média/correlação de marcadores sem co-variáveis clínicas

		HER2	TGF- α	AMPHI	EGF
BECOG	n	96	96	93	95
0	53	15.50	13.30	41.69	240.54
1	42	13.54	11.05	28.40	394.35
>1	1	12.53	13.39	11.15	125.45
PRITCN					
<=4	46	13.94	14.40	19.5	293.37
>4	50	15.22	10.40	51.06	320.43
Carga de tumor	93	.04	.09	0	.02
DIAGDUR	96	-.09	.07	.04	.1

Fig.10

Fig.11

Determinação de cutoff usando PFD

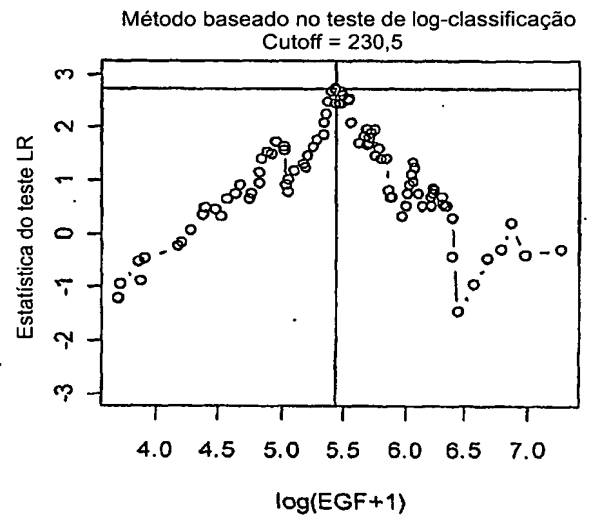
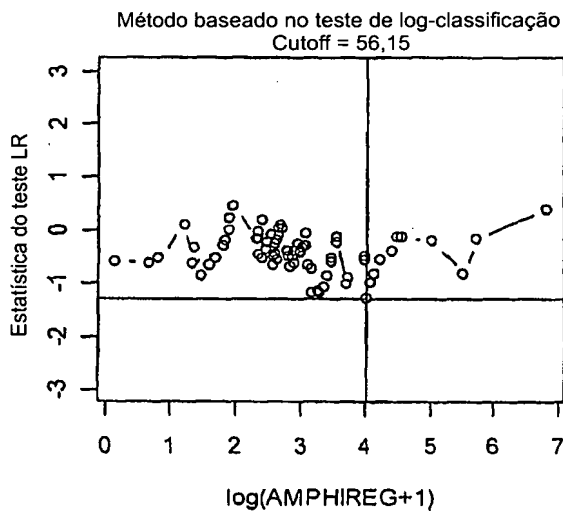
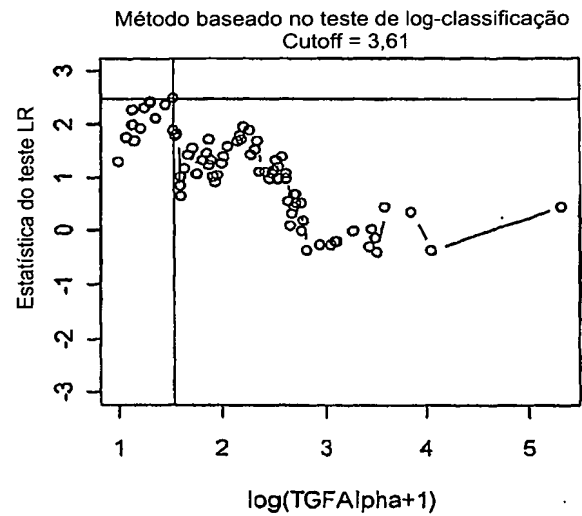
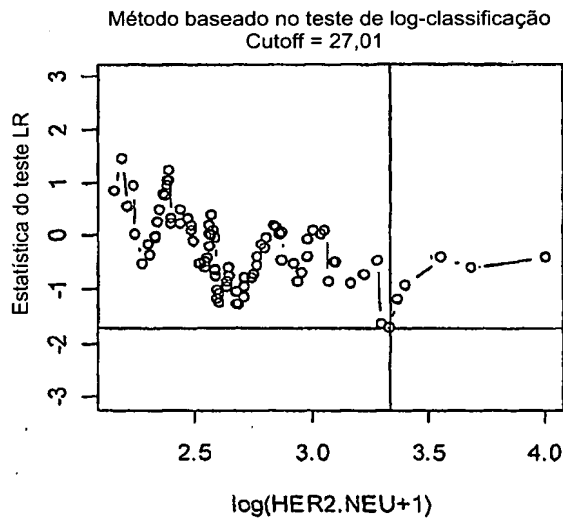
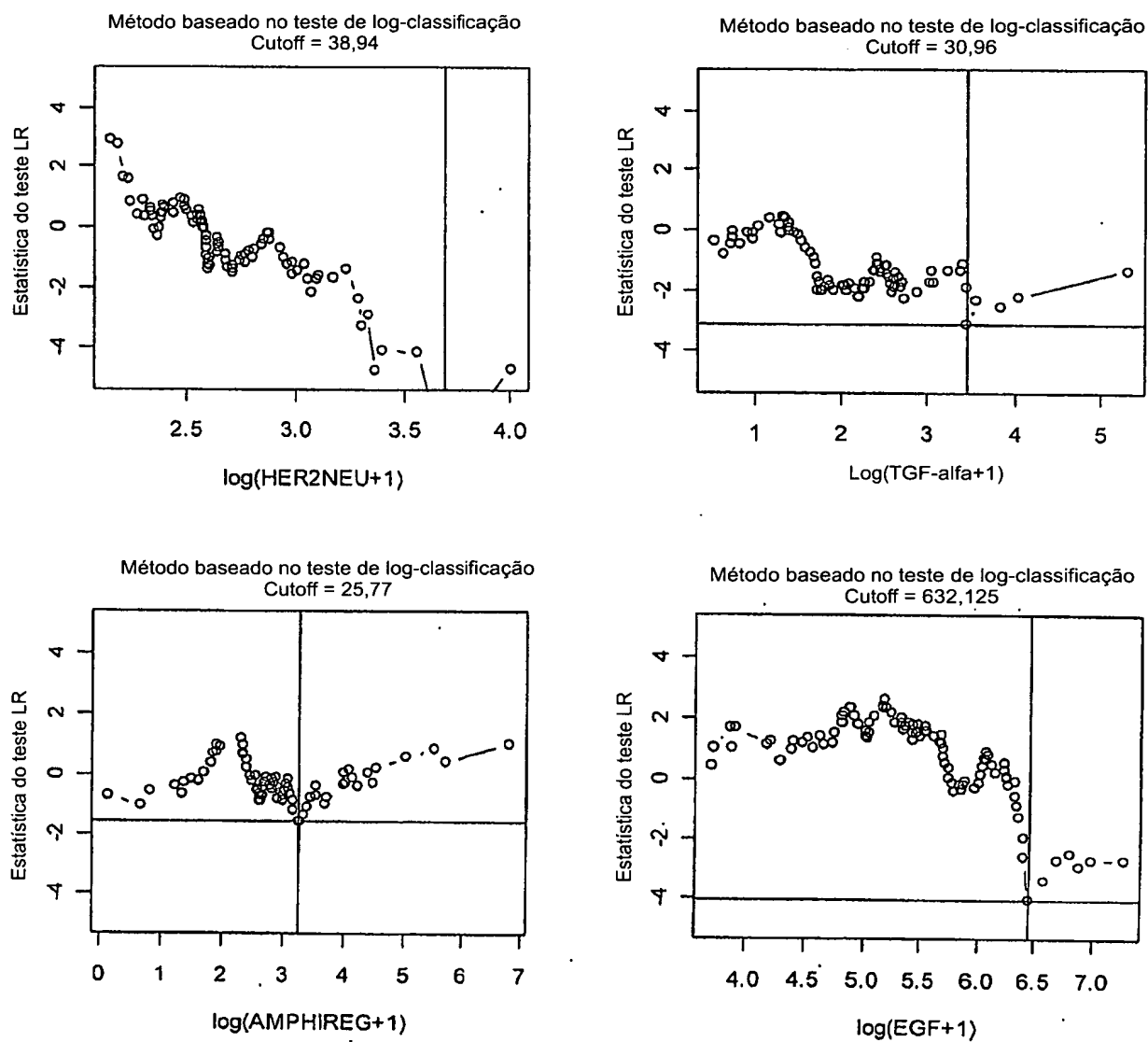


Fig.12

Determinação de cutoff usando OS



Distribuição de pacientes de acordo com cutoffs

	Perc. VERDADEIROS	Perc. FALSOS
HER2>=13.62	40	60
TGF>=8.06	47	53
AMPHI>=56.15	12	88
EGF>=230.5	54	46
TGF=HI, EGF=HI	29	71

(Uma função de dois marcadores, ambos HI)

Fig.13

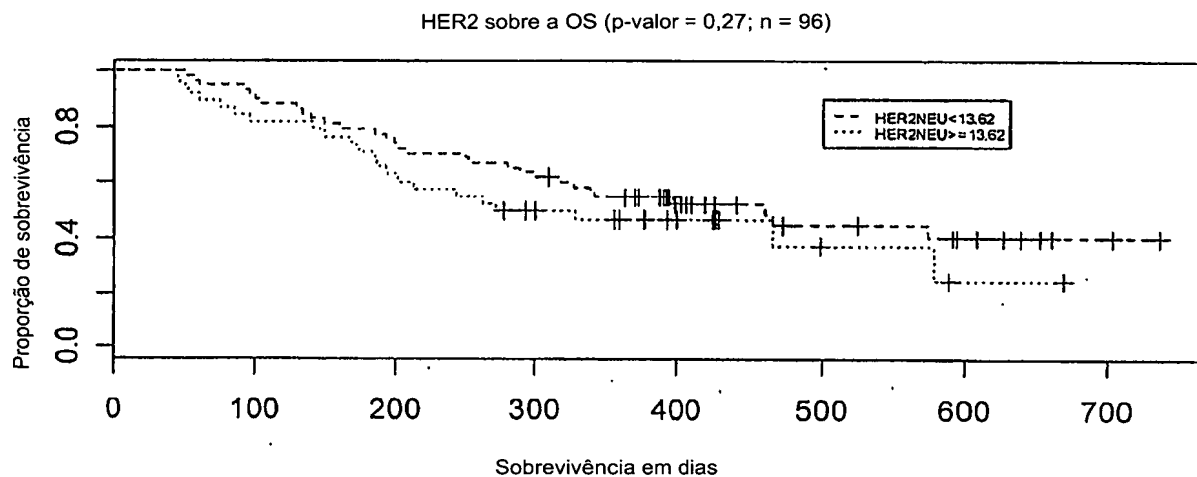
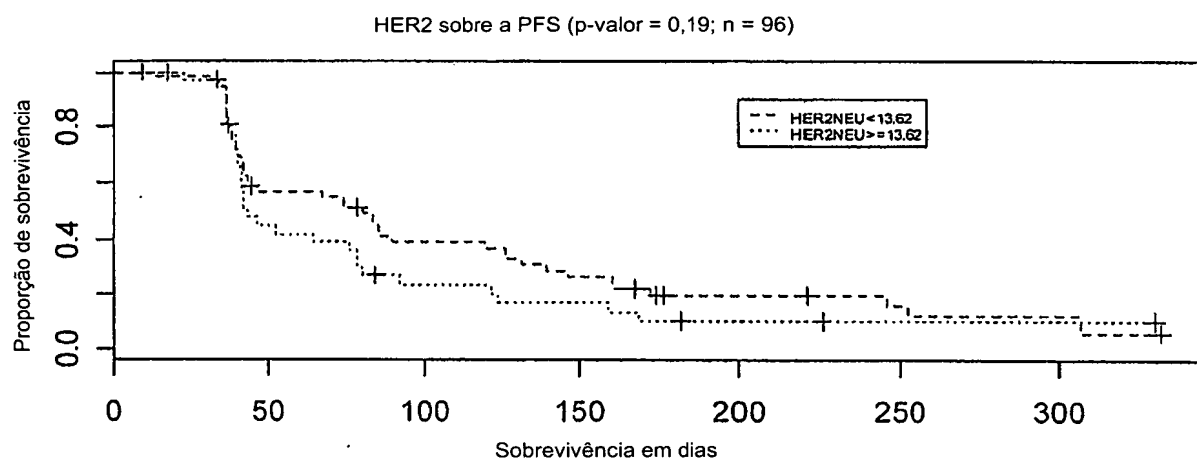
Fig.14**HER2**

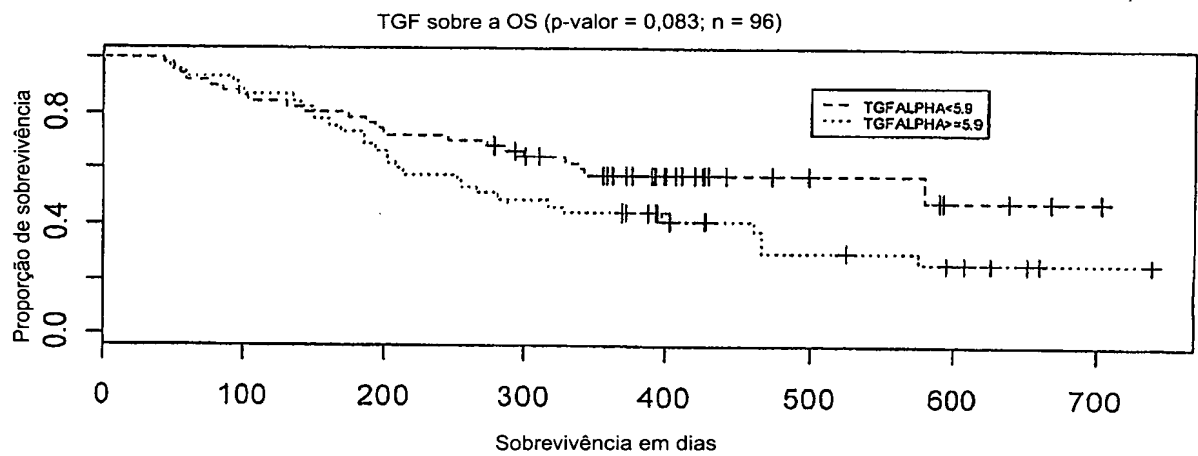
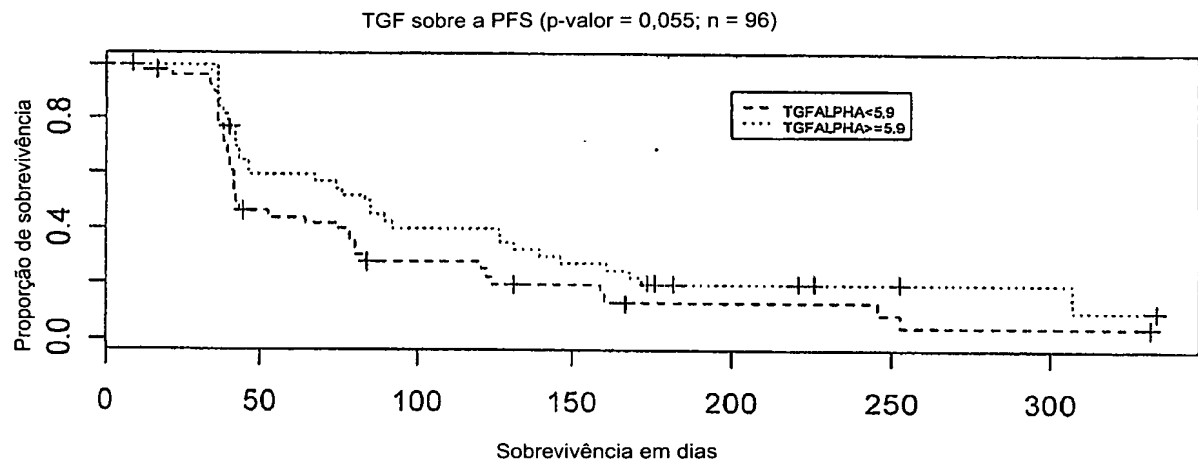
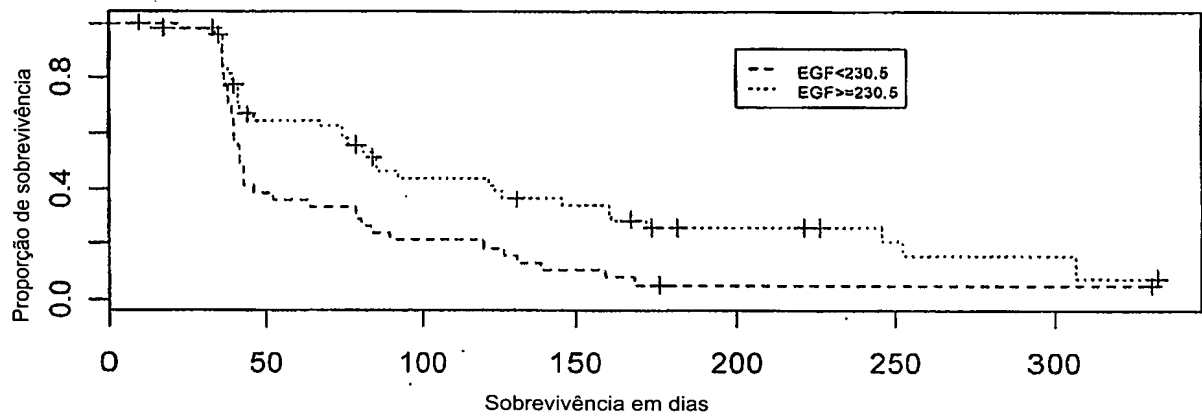
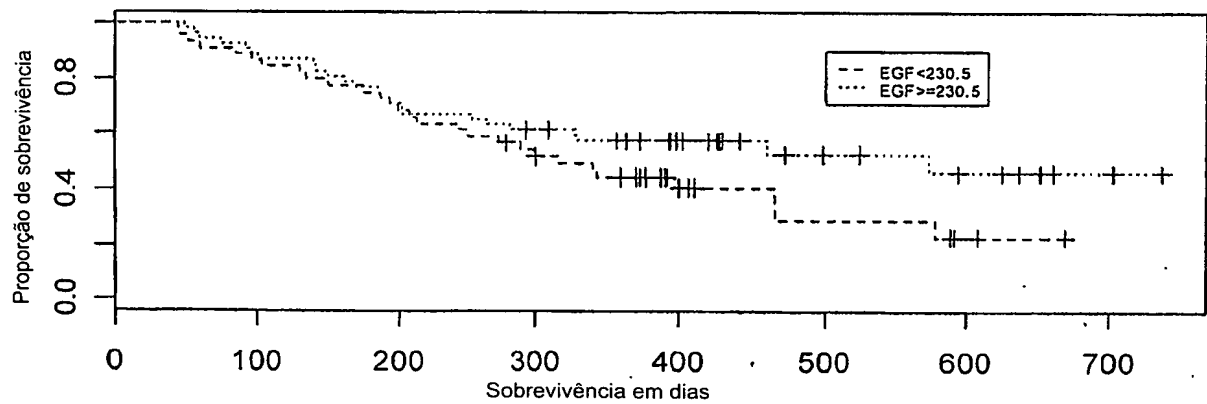
Fig.15**TGF- α** 

Fig.16**EGF**

EGF sobre a PFS (p-valor = 0,0075; n = 96)



EGF sobre a OS (p-valor = 0,14; n = 96)



8107/2077-0

RESUMO

Patente de Invenção: "PROLONGAMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER COM NÍVEIS ELEVADOS DE EGF OU TGF-ALFA".

5

A presente invenção refere-se ao prolongamento da sobrevivência em um paciente com câncer, onde o paciente está produzindo um nível elevado de EGF ou TGF-alfa, através de tratamento do paciente com um inibidor de dimerização de HER, tal como pertuzumab.

Novo quadro reivindicatório (total de 92 reivindicações), incorporando as emendas às reivindicações apresentadas à WIPO sob o artigo 19.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer compreendendo administração de um inibidor de dimerização de HER ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do
5 paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) e o câncer é selecionado do grupo consistindo de câncer ovariano, câncer peritoneal e câncer do tubo falopiano.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é
10 determinado como produzindo um nível elevado de EGF.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que se descobriu que há um nível elevado de EGF no soro do paciente.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de TGF-alfa.
- 15 5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que se descobriu que há um nível elevado de TGF-alfa no soro do paciente.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de dimerização de HER é inibidor de dimerização de HER2.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de
20 dimerização de HER inibe heterodimerização de HER.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo se liga a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EGFR,
25 HER2 e HER3.
10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo se liga a HER2.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo ao HER2 se liga ao Domínio II do domínio extracelular de HER2.
- 30 12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo se liga a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o anticorpo ao HER compreende as seqüências de aminoácido de cadeia pesada variável e leve variável em SEQ ID NOs 3 e 4, respectivamente.

5 14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

15. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo nu.

16. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo intacto.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo ao HER é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

15 19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer ovariano resistente à platina.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o câncer é câncer peritoneal primário ou do tubo de falópio.

20 21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o inibidor de dimerização de HER é administrado como um único agente anti-tumor.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, compreendendo administração de um agente terapêutico secundário ao paciente.

25 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo de agente quimioterapêutico, anticorpo ao HER, anticorpo dirigido contra um antígeno tumor-associado, composto anti-hormonal, cardioprotetor, citocina, fármaco EGFR-objetivado, agente anti-angiogênico, inibidor de quinase de tirosina, inibidor de COX, fármaco anti-inflamatório não esteroide, inibidor de farnesil transferase, anticorpo que se liga à proteína oncofetal CA 125, vacina de HER2, terapia de objetivação de HER, inibidor de Raf ou ras, doxorubicina lipossô-

30

mica, topotecan, taxano, inibidor duplo de quinase de tirosina, TLK286, EMD-7200, um medicamento que trata náusea, um medicamento que previne ou trata *rash* cutâneo ou terapia padrão para acne, um medicamento que trata ou previne diarreia, um medicamento para redução da temperatura corporal e um fator de crescimento hematopoiético.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que o segundo agente terapêutico é um agente quimioterapêutico.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o agente quimioterapêutico é um agente quimioterapêutico anti-metabólito.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o agente quimioterapêutico anti-metabólito é gemcitabina.

27. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o segundo agente terapêutico é trastuzumab, erlotinib ou bevacizumab.

28. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a sobrevivência de progressão livre (PFS) é prolongada.

29. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a sobrevivência global (OS) é prolongada.

30. Método para prolongar a sobrevivência de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a sobrevivência do paciente, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o paciente tem câncer ovariano.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, ou a reivindicação 31 em que o paciente tem câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, ainda compreendendo administração de um agente quimioterapêutico ao paciente.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o agente

quimioterapêutico é um agente quimioterapêutico anti-metabólito.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que o agente quimioterapêutico anti-metabólito é gemcitabina.

5 36. Método para prolongar a sobrevivência de progressão livre (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que o soro do paciente é determinado como tendo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) no mesmo.

10 37. Método para prolongar a sobrevivência de progressão livre (PFS) de um paciente com câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio compreendendo administração de pertuzumab ao paciente em uma quantidade a qual prolonga a PFS no paciente, em que o soro do paciente é determinado como tendo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa) no mesmo.

15 38. Método de acordo com a reivindicação 26 ou a reivindicação 37, em que o câncer é câncer ovariano.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o câncer ovariano é câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

20 40. Método de seleção de um paciente para tratamento com um inibidor de dimerização de HER compreendendo tratamento do paciente com o inibidor de dimerização de HER se o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

25 41. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a sobrevivência do paciente é prolongada com relação à sobrevivência do paciente que não produz um nível elevado de EGF ou TGF-alfa e recebe o mesmo tratamento.

30 42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a sobrevivência é sobrevivência global (OS).

43. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a sobrevivência é sobrevivência de progressão livre (PFS).

44. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o inibidor de dimerização de HER é um inibidor de dimerização de HER2.

45. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o inibidor de dimerização de HER inibe heterodimerização de HER.

5 46. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo se liga a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EGFR, HER2 e HER3.

10 48. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o anticorpo se liga a HER2.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que o anticorpo ao HER2 se liga ao Domínio II do domínio extracelular de HER2.

15 50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo se liga a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o anticorpo ao HER compreende as seqüências de aminoácido de cadeia pesada variável e leve variável em SEQ ID N^{os} 3 e 4, respectivamente.

20 52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

53. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo nu.

25 54. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo intacto.

55. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o anticorpo ao HER é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno.

30 56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 55, ainda compreendendo tratamento do referido paciente com um agente quimioterapêutico.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o agente

quimioterapêutico é gemcitabina.

58. Kit compreendendo um inibidor de dimerização de HER e uma bula de embalagem ou rótulo indicando um uso benéfico para o inibidor de dimerização de HER se o paciente a ser tratado produz um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

59. Método como definido na reivindicação 58, em que o câncer é câncer ovariano, peritoneal ou do tubo de falópio.

60. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o uso benéfico é prolongamento de sobrevivência.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, em que a sobrevivência é sobrevivência de progressão livre.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 61, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, em que o anticorpo é um anticorpo ao HER2.

64. Método de acordo com a reivindicação 63, em que o anticorpo é pertuzumab.

65. Método para promover um inibidor de dimerização de HER para tratar pacientes que produzem um nível elevado de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator alfa de crescimento de transformação (TGF-alfa).

66. Método de acordo com a reivindicação 65, em que a promoção é na forma de um material por escrito.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, em que a promoção é na forma de uma bula para embalagem.

68. Método de seleção de um paciente com câncer para tratamento com inibidor de dimerização de HER compreendendo determinação do nível de fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator-alfa de crescimento de transformação (TGF- α) no referido paciente com câncer e seleção do referido paciente com câncer para tratamento com o referido inibidor de dimerização de HER, se o referido paciente é determinado como produzindo

um nível elevado de EGF ou TGF- α .

69. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de EGF.

5 70. Método de acordo com a reivindicação 69, em que o paciente é determinado como tendo um nível elevado de EGF em um fluido biológico do referido paciente.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, em que o fluido biológico é selecionado do grupo consistindo de sangue, plasma, soro, urina, saliva e fluido de ascite.

10 72. Método de acordo com a reivindicação 71, em que o fluido biológico é soro.

73. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de TGF- α .

15 74. Método de acordo com a reivindicação 73, em que o paciente é determinado como produzindo um nível elevado de TGF- α em um fluido biológico do referido paciente.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, em que o fluido biológico é selecionado do grupo consistindo de sangue, plasma, soro, urina, saliva e fluido de ascite.

20 76. Método de acordo com a reivindicação 75, em que o fluido biológico é soro.

77. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o câncer é selecionado do grupo consistindo de câncer ovariano, câncer peritoneal e câncer do tubo de falópio.

25 78. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o inibidor de dimerização de HER é um inibidor de dimerização de HER2.

79. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o inibidor de dimerização de HER inibe a heterodimerização de HER.

30 80. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o inibidor de dimerização de HER é um anticorpo ao HER.

81. Método de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo se liga a um receptor de HER selecionado do grupo consistindo de EG-

FR, HER2 e HER3.

82. Método de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo se liga a HER2.

5 83. Método de acordo com a reivindicação 82, em que o anticorpo ao HER2 se liga ao Domínio II do domínio extracelular de HER2.

84. Método de acordo com a reivindicação 82, em que o anticorpo se liga a uma junção entre os domínios I, II e III do domínio extracelular de HER2.

10 85. Método de acordo com a reivindicação 82, em que o anticorpo ao HER compreende as seqüências de aminoácido de cadeia pesada variável e leve variável em SEQ ID N^{os} 3 e 4, respectivamente.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, em que o inibidor de dimerização de HER é pertuzumab.

15 87. Método de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo nu.

88. Método de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo ao HER é um anticorpo intacto.

20 89. Método de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo ao HER é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno.

90. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 89, em que o câncer é câncer ovariano avançado, resistente ou recorrente.

91. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 89, em que o câncer é câncer ovariano resistente à platina.

25 92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 89, em que o câncer é câncer peritoneal primário ou do tubo de falópio.