



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112016020752-1 B1

(22) Data do Depósito: 10/03/2015

(45) Data de Concessão: 14/11/2023

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 47/00; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/03/2014 US 61/950,963.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): JESSICA R. KIRSHNER; DOUGLAS MACDONALD; GAVIN THURSTON; JOEL H. MARTIN; FRANK DELFINO; THOMAS NITTOLI; MARCUS KELLY.

(86) Pedido PCT: PCT US2015019722 de 10/03/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/138460 de 17/09/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/09/2016

(57) Resumo: ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente descrição fornece anticorpos que se ligam à variante de classe III de EGFR (EGFRvIII) e aos métodos de uso dos mesmos. De acordo com determinadas modalidades, os anticorpos da descrição ligam-se à EGFRvIII humana com afinidade alta. Os anticorpos da descrição podem ser anticorpos completamente de humanos. A descrição inclui anticorpos anti-EGFRvIII conjugados com um agente citotóxico, radionuclídeo, ou outra porção prejudicial para o crescimento celular ou proliferação celular. Os anticorpos da descrição são úteis para tratamento de vários cânceres.

“ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se aos anticorpos humanos e aos fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos humanos que especificamente se ligam aos mutantes de deleção do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), em particular, ao mutante de deleção de classe III, EGFRvIII, e aos métodos terapêuticos e diagnósticos de uso daqueles anticorpos.

FUNDAMENTOS

[002] A superexpressão e/ou a amplificação de gene receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*), ou EGFR, têm sido relatadas em múltiplos tumores humanos, incluindo aqueles em carcinomas de mama, ovariano, de bexiga, de cérebro, e vários carcinomas escamosos (Wong, A.J. *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6899-6903; Harris *et al.*, 1992, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 11:181 -187). Entretanto, a seleção do alvo EGFR como um método terapêutico antineoplásico tem sido problemática porque muitos tecidos normais expressam também este receptor e podem ser selecionados como alvo juntamente com os alvos neoplásicos. Entretanto, tem sido relatado que muitos glioblastomas tendo a amplificação de gene EGFR com frequência contêm rearranjo de gene (Ekstrand, A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4309-4313; Wong A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2965-2969). Em um estudo, foi descoberto que 17 de 44 glioblastomas têm uma ou mais alterações na sequência que codifica EGFR e todos estes casos

continham EGFR amplificado, enquanto que nenhum dos 22 casos sem amplificação de gene mostrou quaisquer anormalidades de sequência específica para tumor (Frederick, L. *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60:1383-1387). O mesmo estudo mostrou também que múltiplos tipos de mutações em EGFR puderam ser detectadas em tumores individuais.

[003] Uma variante de classe III de EGFR (EGFRvIII) é a variante de EGFR mais frequentemente encontrada em glioblastoma (Bigner *et al.*, 1990, *Cancer Res.* 50:8017-8022; Humphrey *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4207-4211; Yamazaki *et al.*, 1990, *Jap. J. Cancer Res.* 81:773-779; Ekstrand *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4309-4313; Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:3140-3148; e Frederick *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60:1383- 1387). EGFRvIII é caracterizada por uma deleção de éxons 2-7 do gene EGFR, resultando em uma deleção em fase de 801 pares de bases da região codificadora, isto é, deleção de 6-273 resíduos de aminoácido (com base nos números de resíduo de EGFR maduro), e também a geração de uma nova glicina na junção de fusão (Humphrey *et al.*, 1988, *Cancer Res.* 48:2231-2238; Yamazaki *et al.*, 1990, *supra*). Tem sido mostrado que a EGFRvIII tem uma atividade de quinase independente de ligante, fraca, mas constitutivamente ativa e também tumorigenicidade intensificada (Nishikawa *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7727-7731; e Batra *et al.*, 1995, *Cell Growth and Differentiation* 6:1251-1259). Além de nos gliomas, a EGFRvIII tem sido detectada em carcinomas ductal e intraductal de mama (Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:3140-3148), carcinoma de pulmão de célula não pequena (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53:3217-3220), carcinomas ovarianos (Moscatello *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:5536-5539), câncer de próstata (Olapade-Olaopa *et al.*, 2000, *British J Cancer* 82:186-194), e carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (Tinhofer *et al.*, 2011, *Clin. Cancer Res.* 17(15):5197-5204). Em contraste, estes e outros estudos relatam que os tecidos normais não expressam EGFRvIII

(Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *supra*; Wikstrand *et al.*, 1995, *supra*; e Wikstrand *et al.*, 1998, *J. Neuro. Virol.* 4:148- 158). A natureza elevadamente específica para tumor de EGFRvIII torna-a um alvo especialmente útil para tratamento de cânceres e tumores que expressam esta molécula.

[004] As sequências de ácido nucleico e de aminoácidos de EGFR humano são mostradas em SEQ ID NOs: 145 e 146, respectivamente, e a sequência de aminoácidos de EGFRvIII é mostrada em SEQ ID NO:147. Os anticorpos anti-EGFRvIII são descritos, por exemplo, em US 5.212.290, US 7.736.644, US 7.589.180 e US 7.767.792.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] A presente invenção fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação a antígeno que se ligam à EGFRvIII. Os anticorpos da invenção são úteis, *inter alia*, para selecionar, como alvo, células de tumor que expressam EGFRvIII. Os anticorpos anti-EGFRvIII da invenção, e suas porções de ligação a antígeno, podem ser usados (usadas) sozinhos (sozinhas) sob a forma não modificada, ou podem ser incluídos (incluídas) como parte de um conjugado de anticorpo-droga ou de um anticorpo biespecífico.

[006] Os anticorpos da invenção podem ser de comprimento total (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou podem compreender apenas uma porção de ligação a antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂ ou scFv), e podem ser modificados para afetar a funcionalidade, por exemplo, para eliminar funções efectoras residuais (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

[007] Os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores da presente invenção são listados aqui nas Tabelas 1 e 2. A Tabela 1 apresenta os identificadores de sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada (HCVRs, *Heavy Chain Variable Regions*), das regiões variáveis de cadeia leve (LCVRs, *Light Chain Variable Regions*), das regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (*Heavy Chain*

Complementarity Determining Regions, HCDR1, HCDR2 e HCDR3), e das regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (*Light Chain Complementarity Determining Regions*, LCDR1, LCDR2 e LCDR3) dos anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores. A Tabela 2 apresenta os identificadores de sequências de ácido nucleico das HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dos anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores.

[008] A presente invenção fornece anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[009] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0010] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo um par de sequências de aminoácidos de uma HCVR e uma LCVR (HCVR/LCVR) compreendendo qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1 pareada com qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1. De acordo com determinadas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação a antígeno, compreendendo um par de sequências de

aminoácidos de HCVR/LCVR contido dentro de qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1. Em determinadas modalidades, o par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR é selecionado do grupo consistindo em: 2/20, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, e 130/138.

[0011] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR1 de cadeia pesada (HCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0012] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR2 de cadeia pesada (HCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0013] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0014] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR1 de cadeia leve (LCDR1) compreendendo uma

sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0015] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR2 de cadeia leve (LCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0016] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo uma CDR3 de cadeia leve (LCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0017] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo um par de sequências de aminoácidos de uma HCDR3 e de uma LCDR3 (HCDR3/LCDR3) compreendendo qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1 pareadas com qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1. De acordo com determinadas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação a antígeno, compreendendo um par de sequências de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 contido dentro de qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1.

[0018] A presente invenção fornece, também, anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1- HCDR2- HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contendo dentro de qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1. Em determinadas modalidades, o conjunto de sequências de aminoácidos de HCDR1-HCDR2- HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 é selecionado do grupo consistindo em: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62- 64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; e 132-134-136-140-142-144.

[0019] Em uma modalidade relacionada, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contendo dentro de um par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR como definidas em qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno que especificamente se ligam à EGFRvIII, compreendendo o conjunto de sequências de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contido dentro de um par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR selecionado do grupo consistindo em 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; e 370/378. Métodos e técnicas para identificar as CDRs dentro das sequências de aminoácidos de HCVR e de LCVR são bem conhecidos (conhecidas) na técnica e podem ser usados (usadas) para identificar as CDRs dentro das sequências de aminoácidos de HCVR e/ou de LCVR especificadas aqui descritas. As convenções exemplificadoras que podem ser usadas para identificar os limites de CDRs incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia, a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat é baseada na

variabilidade de sequência, a definição de Chothia é baseada na localização das regiões de alça estrutural, e a definição de AbM é um meio-termo entre as abordagens de Kabat e de Chothia. Consulte, por exemplo, Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); e Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9268-9272 (1989). Bases de dados públicas também estão disponíveis para identificar as sequências de CDR dentro de um anticorpo.

[0020] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos anti-EGFRvIII ou suas porções. Por exemplo, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0021] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0022] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR1 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de

ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico HCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0023] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR2 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico HCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0024] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico HCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0025] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR1 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico LCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0026] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR2 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico LCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0027] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico LCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma.

[0028] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR, em que a HCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 é como definido por qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1.

[0029] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido nucleico que codificam uma LCVR, em que a LCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, LCDR1-LCDR2-LCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 é como definido por qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores listados na Tabela 1.

[0030] A presente invenção fornece, também, moléculas de ácido

nucleico que codificam ambas uma HCVR e uma LCVR, em que a HCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1, e em que a LCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1. Em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma, e uma sequência de polinucleotídeo selecionada de qualquer uma dentre as sequências de ácido nucleico LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sua sequência substancialmente similar tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência em relação à mesma. Em determinadas modalidades de acordo com este aspecto da invenção, a molécula de ácido nucleico codifica uma HCVR e uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR são ambas derivadas do mesmo anticorpo anti-EGFRvIII listado na Tabela 1.

[0031] A presente invenção fornece, também, vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia leve ou pesada de um anticorpo anti-EGFRvIII. Por exemplo, a presente invenção inclui vetores de expressão recombinantes compreendendo qualquer uma dentre as moléculas de ácido nucleico mencionadas acima, isto é, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma dentre as sequências de HCVR, LCVR, e/ou CDR apresentadas na Tabela 1. São também incluídas dentro do escopo da presente invenção células hospedeiras dentro das quais tais vetores têm estado introduzidos, e também métodos de produzir os anticorpos ou suas porções pela cultura das células hospedeiras sob condições que permitem a produção dos anticorpos ou

de fragmentos de anticorpo, e de recuperar os anticorpos e os fragmentos de anticorpo assim produzidos.

[0032] A presente invenção inclui anticorpos anti-EGFRvIII tendo um padrão de glicosilação modificado. Em algumas modalidades, pode ser útil a modificação para remover sítios de glicosilação indesejáveis, ou um anticorpo isento de uma porção fucose presente na cadeia de oligossacarídeo, por exemplo, para intensificar a função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (consulte Shield *et al.* (2002) *JBC* 277:26733). Em outras aplicações, modificação de galactosilação pode ser feita com a finalidade de modificar a citotoxicidade dependente de complemento (CDC, *Complement Dependent Cytotoxicity*).

[0033] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo recombinante humano ou fragmento do mesmo que especificamente se liga à EGFRvIII e um carreador farmacêuticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a invenção caracteriza-se por uma composição que é uma combinação de um anticorpo anti-EGFRvIII e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com um anticorpo anti-EGFRvIII. A presente invenção fornece, também, conjugados de anticorpo-droga (ADCs, *Antibody-Drug Conjugates*) compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII conjugado com um agente citotóxico. Terapias de combinação exemplificadoras, coformulações exemplificadoras, e ADCs exemplificadores que envolvem os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção são aqui descritas (descritos) em outro lugar.

[0034] Em ainda um outro aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para matar células tumorais ou para inibir ou atenuar o crescimento de células tumorais usando um anticorpo anti-EGFRvIII ou uma porção de ligação a antígeno de um anticorpo da invenção. Os métodos terapêuticos de acordo com este aspecto da invenção compreendem

administrar uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da invenção a um indivíduo que necessita da mesma. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que é melhorada, inibida ou prevenida pela seleção como alvo de EGFRvIII e/ou pela inibição de sinalização de célula mediada por ligante através de EGFRvIII.

[0035] Outras modalidades tornar-se-ão evidentes a partir de uma análise da descrição detalhada a seguir. Outras modalidades tornar-se-ão evidentes a partir de uma análise da descrição detalhada a seguir.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

[0036] Figura 1 mostra os resultados de transferência de western (*western blot*) de EGFR e EGFRvIII usando anticorpos anti-EGFRvIII [isto é, H1H1863N2(Fuc-), e Controles I e II em Figura 1a; e H1H1911, H1H1912, e H1H1915 em Figura 1b], ou anticorpo anti-His, sob condições reduzidas (painéis superiores) e não reduzidas (painéis inferiores). Pistas 1 e 6: 10 µL de padrão BENCHMARK™ (INVITROGEN™); Pistas 2 e 7: 400 ng de hEGFR-mmh (SEQ ID NO:154); Pistas 3 e 8: 400 ng de hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152); e Pistas 4, 5, 9 e 10: espaço. Controle I: Anticorpo humano (IgG1) anti-peptídeo juncional de EGFRvIII descrito em Patente U.S. nº 7.736.644; e Controle II: Anticorpo quimérico anti- EGFRvIII/EGFR descrito em Patente U.S. nº 7.589.180.

[0037] Figura 2 mostra as características de ligação de H1H1863N2(Fuc-). O peptídeo juncional de EGFRvIII ou o peptídeo de resíduos 311-326 de EGFR (“peptídeo EGFR311-326”), cada um dos quais foi etiquetado via um ligante com biotina na terminação-C, foi capturado em pontas OCTET® revestidas com estreptavidina em um instrumento FORTEBIO® OCTET® RED e reagidos com H1H1863N2(Fuc-) ou Controles I-III. Controles I e II: Iguais aos controles acima; e Controle III: Anticorpo humanizado (hIgG1) anti-EGFRvIII descrito na Publicação de

Pedido de Patente U.S. nº 2010/0056762. (□): Peptídeo juncional de EGFRvIII marcado com biotina C-terminal (SEQ ID NO:149); e (■): peptídeo EGFR311-326 marcado com biotina C-terminal (SEQ ID NO:151).

[0038] Figura 3 mostra a internalização de mAb anti-EGFRvIII por células HEK293 que expressam EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII). Os anticorpos de controle e os anticorpos anti-EGFRvIII ligados à superfície de célula foram detectados pelo anticorpo secundário (Fab) conjugado com corante; as imagens foram adquiridas a 40x e as vesículas internalizadas foram quantificadas. Controles I e II: Iguais aos controles acima; e Controle IV: Anticorpo quimérico anti-EGFR descrito na Patente U.S. nº 7.060.808. (□): Internalização a 37°C; e (■): Internalização a 4°C.

[0039] Figura 4 mostra a ligação e a internalização de anticorpo H1H1863N2(Fuc-) anti-EGFRvIII pelos tumores B16F10.9 ou tumores B16F10.9 que expressam EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII) que foram xenoenxertados em vários camundongos sofrendo de imunodeficiência severa combinada (SCID, *Severe Combined ImmunoDeficiency*). Anticorpo isótipo de controle ou anticorpo anti-EGFRvIII ligado à superfície de célula (Figura 4a) ou anticorpo anti-EGFRvIII ligado à superfície de célula mais internalizado (Figura 4b), foi detectado por anticorpo anti-Fc humano conjugado com alofococianina (hFc-APC, *AlloPhycocyanin Conjugated anti-human Fc*) usando citometria de fluxo. São mostradas as intensidades de fluorescência médias (MIF, *Mean Fluorescence Intensities*) a 10 minutos (□), 4 horas (▤), e 24 horas (■) após a injeção de anticorpo.

[0040] Figura 5 mostra os resultados de análise farmacocinética para o anticorpo H1H863N2(Fuc+) anti-EGFRvIII (Fig. 5d) e os anticorpos de controle (como descrito acima), isto é, Controle I (Fig. 5b), Controle III (Fig. 5c), e Controle IV (Fig. 5a), em camundongos de tipo selvagem (*wild-type*, *wt*) (●) ou camundongos que expressam EGFR humano (■).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0041] Antes de a presente invenção se descrita, deve ser entendido que esta invenção não é limitada aos métodos específicos e às condições experimentais específicas descritos (descritas), porque tais métodos e condições podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia aqui usada é para a finalidade de descrever apenas modalidades específicas, e não é pretendida para ser limitadora, porque o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

[0042] A não ser que sejam definidos de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como comumente entendidos por uma pessoa comumente versada na técnica à qual pertence esta invenção. Como aqui usado, o termo, “cerca de”, quando usado com referência a um valor numérico citado específico, significa que o valor pode variar a partir do valor citado em não mais que 1%. Por exemplo, como aqui usada, a expressão “cerca de 100” inclui 99 e 101 e todos os valores dentro da faixa de 99 a 101 (por exemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

[0043] Embora qualquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. Todas as patentes, todos os pedidos e todas as publicações de não patente mencionadas (mencionados) neste relatório descritivo são aqui incorporadas (incorporados) em suas totalidades.

Definições

[0044] O termo “EGFRvIII”, como aqui usado, refere-se a uma variante de classe III de EGFR humano tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:147, ou um fragmento do mesmo biologicamente ativo, que apresenta quaisquer características específicas para EGFRvIII, diferentes daquelas em comum com o EGFR normalmente expressado, a não ser que seja especificamente indicado de outro modo. EGFRvIII não contém os resíduos de aminoácido 6 até 273 de EGFR maduro (isto é, SEQ ID

NO:146 sem o peptídeo de sinal, isto é, resíduos 1-24) e contém um novo resíduo de glicina na posição 6 entre os resíduos de aminoácido 5 e 274.

[0045] Todas as referências aqui às proteínas, aos polipeptídeos e aos fragmentos de proteína são pretendidas para se referirem à versão humana da respectiva proteína, do respectivo polipeptídeo ou do respectivo fragmento de proteína a não ser que seja explicitamente especificada como sendo de uma espécie não humana. Dessa forma, a expressão “EGFRvIII” significa EGFRvIII humana a não ser que seja especificada como sendo de uma espécie não humana, por exemplo, “EGFRvIII de camundongo”, “EGFRvIII de macaco”, etc.

[0046] Como aqui usada, a expressão, “EGFRvIII expressada em superfície de célula” significa uma ou mais proteína(s) EGFRvIII, ou o seu domínio extracelular, que é/são expressada(s) (expressado) sobre a superfície de uma célula *in vitro* ou *in vivo*, de tal modo que pelo menos uma porção de uma proteína EGFRvIII seja exposta no lado extracelular da membrana celular e seja acessível a uma porção de ligação a antígeno de um anticorpo. Uma “EGFRvIII expressada sobre superfície de célula” pode compreender ou consistir em uma proteína EGFRvIII expressada sobre a superfície de uma célula que normalmente expressa a proteína EGFRvIII. Alternativamente, “EGFRvIII expressada sobre superfície de célula” pode compreender ou consistir em proteína EGFRvIII expressada sobre a superfície de uma célula que normalmente não expressa EGFRvIII humana sobre sua superfície, mas que tem sido artificialmente modificada para expressar EGFRvIII sobre sua superfície.

[0047] Como aqui usada, a expressão “anticorpo anti-EGFRvIII” inclui tanto anticorpos monovalentes com uma especificidade única, quanto anticorpos biespecíficos compreendendo um primeiro braço que se liga à EGFRvIII e um segundo braço que se liga a um segundo antígeno (alvo), em que o braço anti-EGFRvIII compreende qualquer uma dentre as sequências de

HCVR/LCVR ou CDR conforme apresentadas aqui na Tabela 1. A expressão “anticorpo anti-EGFRvIII” também inclui os conjugados de anticorpo-droga (ADCs) compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII ou uma porção do mesmo de ligação a antígeno conjugado (conjugada) com uma droga ou uma toxina (isto é, agente citotóxico). A expressão “anticorpo anti-EGFRvIII” também inclui conjugados de anticorpo-radionuclídeo (ARCs, *Antibody-Radionuclide Conjugates*) compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII ou uma porção do mesmo de ligação a antígeno conjugado (conjugada) com um radionuclídeo.

[0048] O termo “anticorpo”, como aqui usado, significa qualquer molécula ou complexo molecular que se liga ao antígeno compreendendo pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR, *Complementarity Determining Region*) que especificamente se liga a um ou interage com um antígeno específico (por exemplo, EGFRvIII). O termo “anticorpo” inclui moléculas de imunoglobulina compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H, *Heavy*) e duas cadeias leves (L, *Light*) interconectadas por ligações dissulfeto, e também seus multímeros (por exemplo, IgM). Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (*Heavy Chain Variable Region* aqui abreviada como HCVR ou V_H) e uma região constante de cadeia pesada (*Heavy Chain Constant Region*, HCCR). A região constante de cadeia pesada compreende três domínios, C_H1, C_H2 e C_H3. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (*Light Chain Variable Region*, abreviada como LCVR ou V_L) e uma região constante de cadeia leve (*Light Chain Constant Region*, LCCR). A região constante de cadeia leve compreende um domínio (C_L1). As regiões V_H e V_L podem ser, adicionalmente, divididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs, *Complementarity Determining Regions*), entremeadas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de molde (FR, *Framework Regions*).

Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas desde a terminação amino até a terminação carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em modalidades diferentes da invenção, as FRs do anticorpo anti-EGFRvIII (ou de sua porção de ligação a antígeno) podem ser idênticas às sequências de linhagem germinativa humana, ou podem ser natural ou artificialmente modificadas. Uma sequência de aminoácidos de consenso pode ser definida com base em uma análise lado-a-lado de duas ou mais CDRs.

[0049] O termo “anticorpo”, como aqui usado, também inclui fragmentos de ligação a antígeno de moléculas de anticorpo completas. Os termos “porção de ligação a antígeno” de um anticorpo, “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo, e semelhantes, como aqui usados, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, ou enzimaticamente obtenível, sintético (sintética), ou geneticamente modificado (modificada), que especificamente se liga a um antígeno para formar um complexo. Os fragmentos de ligação a antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo completas usando quaisquer técnicas padrão adequadas como técnicas de digestão proteolítica ou de engenharia genética recombinante envolvendo a manipulação e a expressão de DNA que codifica os domínios variáveis e opcionalmente constantes do anticorpo. Tal DNA é conhecido e/ou está facilmente disponível em, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo), ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou pelo uso de técnicas de biologia molecular, por exemplo, para arranjar um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[0050] Exemplos não limitadores de fragmentos de ligação a antígeno

incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadeia única (scFv, *single-chain Fv*); (vi) fragmentos dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimas consistindo em os resíduos de aminoácido que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada como um peptídeo CDR3), ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restringido. Outras moléculas modificadas, como anticorpos domínio-específicos, anticorpos de domínio único, anticorpos domínio-deletados, anticorpos quiméricos, anticorpos CDR-enxertados, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), imunodrogas modulares pequenos (SMIPs, *Small Modular ImmunoPharmaceuticals*), e domínios variáveis IgNAR de tubarão, são também considerados como dentro da expressão “fragmento que se liga a antígeno”, conforme aqui usada.

[0051] Um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo tipicamente compreenderá um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e de modo geral compreenderá pelo menos uma CDR que é adjacente à(s) ou está em fase com uma ou mais sequências de molde. Em fragmentos de ligação a antígeno tendo um domínio V_H associado com um domínio V_L, os domínios V_H e V_L podem estar situados relativamente um ou outro em qualquer arranjo adequado. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros V_H-V_H, V_H-V_L ou V_L-V_L. Alternativamente, o fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo pode conter um domínio monomérico V_H ou V_L.

[0052] Em determinadas modalidades, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável covalentemente ligado a pelo menos um domínio constante. Configurações exemplificadoras não limitadoras de domínios variáveis e constantes que podem ser encontrados dentro de um fragmento de ligação a antígeno de um

anticorpo da presente invenção incluem: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; e (xiv) V_L-C_L . Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma dentre as configurações exemplificadoras acima, os domínios variáveis e constantes podem ser quer ligados diretamente uns aos outros quer ligados por uma região ligante ou de dobradiça completa ou parcial. Uma região de dobradiça pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos que resultam em uma ligação flexível ou semiflexível entre domínios adjacentes variáveis e/ou constantes em uma única molécula de polipeptídeo. Além disso, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma dentre as configurações de domínios variáveis e constantes listadas acima em associação não covalente uns com os outros e/ou com um ou mais domínios monoméricos V_H ou V_L (por exemplo, por ligação dissulfeto (ligações dissulfeto)).

[0053] Do mesmo modo que como as moléculas de anticorpo completas, os fragmentos de ligação a antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos). Um fragmento multiespecífico que se liga ao antígeno de um anticorpo tipicamente compreenderá pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de especificamente se ligar a um antígeno separado ou a um epítipo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpo biespecífico exemplificadores aqui descritos, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo da presente invenção usando técnicas de rotina na técnica.

[0054] Os anticorpos da presente invenção podem funcionar mediante

citotoxicidade dependente de complemento (CDC, *Complement-Dependent Cytotoxicity*) ou citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*). A “citotoxicidade dependente de complemento” (CDC) refere-se à lise de células que expressam antígeno por um anticorpo da invenção na presença de complemento. A “citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” (ADCC) refere-se a uma reação mediada por célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcRs, *Fc Receptors*) (por exemplo, células matadoras naturais (NK, *Natural Killer*), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado a uma célula alvo e com isso resultam na lise da célula alvo. CDC e ADCC podem ser medidas usando ensaios que são bem conhecidos e disponíveis na técnica. (Consulte, por exemplo, Patentes U.S. n°s 5.500.362 e 5.821.337, e Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656). A região constante de um anticorpo é importante por causa da capacidade de um anticorpo fixar o complemento e mediar a citotoxicidade dependente de célula. Dessa forma, o isótipo de um anticorpo pode ser selecionado com base em se ele é desejável para o anticorpo mediar a citotoxicidade.

[0055] Em determinadas modalidades da invenção, os anticorpos anti-EGFRvIII da invenção são anticorpos humanos. O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, é pretendido para incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulinas de linhagem germinativa humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDRs e em particular CDR3. Entretanto, o termo “anticorpo humano”, como aqui usado, não é pretendido para incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da

linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, têm estado enxertadas nas sequências de molde humanas.

[0056] Os anticorpos da invenção podem, em algumas modalidades, ser anticorpos recombinantes humanos. O termo “anticorpo recombinante humano”, como aqui usado, é pretendido para incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meio recombinante, como anticorpos expressados usando um vetor de expressão recombinante transfectado para dentro de uma célula hospedeira (descrito em detalhe abaixo), anticorpos isolados de uma biblioteca combinatória de anticorpos humanos (descrito em detalhe abaixo), anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (consulte por exemplo, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Cancer Res.* 20:6287-6295) ou anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolve emenda (*splicing*) de sequências de genes de imunoglobulina humana em outras sequências de DNA. Tais anticorpos recombinantes humanos têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas de linhagem germinativa humanas. Em determinadas modalidades, entretanto, tais anticorpos recombinantes humanos são submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humanas é usado, mutagênese somática *in vivo*) e dessa forma as sequências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas com as sequências V_H e V_L de linhagem germinativa humanas, podem não existir na natureza dentro do repertório de anticorpos humanos de linhagem germinativa *in vivo*.

[0057] Os anticorpos humanos podem existir em duas formas que estão associadas com heterogeneidade de dobradiça. Em uma forma, uma molécula de imunoglobulina compreende um constructo de quatro cadeias estável de aproximadamente 150-160 kDa em que os dímeros são mantidos

juntos por uma ligação dissulfeto de intercadeias de cadeias pesadas. Em uma segunda forma, os dímeros não são ligados via ligações dissulfeto de intercadeias e uma molécula de cerca de 75-80 kDa é formada composta de uma cadeia pesada e uma cadeia leve covalentemente copuladas (semi-anticorpo). Estas formas têm sido extremamente difíceis de separar, mesmo após purificação por afinidade.

[0058] A frequência de aparecimento da segunda forma em vários isótipos de IgG intactos é devido, mas não limitado às, diferenças estruturais associadas com o isótipo de região de dobradiça do anticorpo. Uma única substituição de aminoácido na região de dobradiça da dobradiça de IgG4 humana pode significativamente reduzir o aparecimento da segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) para níveis tipicamente observados usando uma dobradiça de IgG1 humana. A presente invenção inclui anticorpos tendo uma ou mais mutações na dobradiça, região CH2 ou CH3 que podem ser desejáveis, por exemplo, na produção, para aprimorar o rendimento da forma de anticorpo desejada.

[0059] Os anticorpos da invenção podem ser anticorpos isolados. Um “anticorpo isolado”, como aqui usado, significa um anticorpo que tem sido identificado e separado e/ou recuperado de pelo menos um componente de seu ambiente natural. Por exemplo, um anticorpo que tem sido separado ou removido de pelo menos um componente de um organismo, ou de um tecido ou de uma célula em que o anticorpo existe de modo natural ou é produzido de maneira natural, é um “anticorpo isolado” para os propósitos da presente invenção. Um anticorpo isolado também inclui um anticorpo *in situ* dentro de uma célula recombinante. Os anticorpos isolados são anticorpos que têm sido submetidos a pelo menos uma etapa de isolamento ou purificação. De acordo com determinadas modalidades, um anticorpo isolado pode estar substancialmente isento de outros compostos químicos e/ou material celular.

[0060] Os anticorpos anti-EGFRvIII aqui descritos podem

compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções nas regiões de molde e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeias pesadas e leves em comparação com as correspondentes sequências de linhagem germinativa das quais os anticorpos foram derivados. Tais mutações podem ser facilmente avaliadas pela comparação das sequências de aminoácidos aqui descritas com as sequências de linhagem germinativa disponíveis em, por exemplo, bases de dados públicas de sequências de anticorpos. A presente invenção inclui anticorpos, e/ou seus fragmentos de ligação a antígeno, que são derivados de qualquer uma dentre as sequências aqui descritas, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de molde e/ou CDR são mutados para o(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência de linhagem germinativa da qual o anticorpo foi derivado, ou para o(s) resíduo(s) correspondente(s) de outra sequência de linhagem germinativa, ou com uma substituição conservativa de aminoácido do(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência de linhagem germinativa (tais alterações na sequência são aqui chamadas coletivamente de “mutações de linhagem germinativa”). Uma pessoa comumente versada na técnica, partindo das sequências de regiões variáveis de cadeias pesadas e leves aqui descritas, pode facilmente produzir numerosos anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa ou suas combinações. Em determinadas modalidades, todos os resíduos de regiões de molde e/ou CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L são mutados de volta para os resíduos encontrados na sequência de linhagem germinativa original da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas determinados resíduos são mutados de volta para a sequência de linhagem germinativa, por exemplo, apenas os resíduos mutados dentro dos primeiros 9 aminoácidos de FR1 ou dentro dos últimos 8 aminoácidos de FR4, ou apenas os resíduos mutados dentro de CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais resíduo(s) de regiões de molde e/ou CDR é (são) mutado(s) para o(s) resíduo(s) correspondente(s) de uma

sequência de linhagem germinativa diferente (isto é, uma sequência de linhagem germinativa que é diferente da sequência de linhagem germinativa da qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações de linhagem germinativa dentro das regiões de molde e/ou CDR, por exemplo, em que determinados resíduos individuais são mutados para o correspondente resíduo de uma sequência de linhagem germinativa específica enquanto que determinados outros resíduos que diferem da sequência de linhagem original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linhagem germinativa diferente. Quando obtidos, os anticorpos e os fragmentos de ligação a antígeno que contêm uma ou mais mutações de linhagem germinativa podem ser facilmente testados para uma ou mais propriedades desejadas como, especificidade de ligação aprimorada, afinidade de ligação intensificada, propriedades biológicas agonísticas ou antagonísticas aprimoradas ou intensificadas (conforme for o caso), imunogenicidade reduzida, etc. Os anticorpos e os fragmentos de ligação a antígeno obtidos nesta maneira geral são incluídos dentro da presente invenção.

[0061] A presente invenção também inclui anticorpos anti-EGFRvIII compreendendo variantes de qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR, e/ou CDR aqui descritas tendo uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-EGFRvIII tendo sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR, e/ou CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. substituições conservativas de aminoácido em relação a qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR, e/ou CDR apresentas aqui na Tabela 1.

[0062] O termo “epítopo” refere-se a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação específico ao antígeno na região variável de

uma molécula de anticorpo conhecido como um parátopo. Um antígeno individual pode ter mais que um epítopo. Dessa forma, anticorpos diferentes podem ligar-se a áreas diferentes sobre um antígeno e podem ter efeitos biológicos diferentes. Os epítomos podem ser quer conformacionais quer lineares. Um epítopo conformacional é produzido por aminoácidos espacialmente justapostos dos diferentes segmentos da cadeia de polipeptídeo linear. Um epítopo linear é um produzido por resíduos de aminoácido adjacentes em uma cadeia de polipeptídeo. Em determinada circunstância, um epítopo pode incluir porções de sacarídeo, grupos fosforila, ou grupos sulfonila no antígeno.

[0063] O termo “identidade substancial” ou “substancialmente idêntico”, quando se refere a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando otimamente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeo apropriadas com outro ácido nucleico (ou sua fita complementar), há identidade de sequência de nucleotídeos em pelo menos cerca de 95%, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, conforme medida por qualquer algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, como FASTA, BLAST ou Gap, conforme discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico tendo identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em determinados casos, codificar um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos igual ou substancialmente similar à sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de referência.

[0064] Como aplicado aos polipeptídeos, o termo “similaridade substancial” ou “substancialmente similar” significa que duas sequências de peptídeo, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna padrão (*default*), compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferencialmente, as porções de

resíduo que não são idênticas diferem pelas substituições conservativas de aminoácido. Uma “substituição conservativa de aminoácido” é uma na qual um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservativa de aminoácido substancialmente não alterará as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos nos quais duas ou mais sequências de aminoácidos diferem umas das outras por substituições conservativas, a identidade de sequência percentual ou o grau de similaridade pode ser ajustada (ajustado) para cima para corrigir devido à natureza conservativa da substituição. Meios para realizar este ajuste são bem conhecidos por aquelas pessoas versadas na técnica. Consulte, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, aqui incorporado como referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais alifáticas com grupo hidroxila: serina e treonina; (3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina, e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, e histidina; (6) cadeias laterais acídicas: aspartato e glutamato, e (7) cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina. Os grupos de substituição conservativa de aminoácidos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer alteração tendo um valor positivo na matriz (de substituição) do logaritmo das probabilidades PAM250 descrita em Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, aqui incorporado como referência. Uma substituição “moderadamente conservativa” é qualquer alteração tendo um valor não negativo na matriz (de substituição) do logaritmo das probabilidades PAM250.

[0065] A similaridade de sequência para polipeptídeos, que é também chamada de identidade de sequência, é tipicamente medida com o uso de programa de computador de análise de sequências. O programa de computador de análise de proteínas verifica a igualdade de sequências similares usando medições de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições conservativas de aminoácido. Por exemplo, o programa de computador GCG contém programas como Gap e Bestfit que podem ser usados com parâmetros padrão (*default*) para determinar homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma sua muteína. Consulte, por exemplo, GCG Version 6.1. As sequências de polipeptídeo também podem ser comparadas usando FASTA utilizando parâmetros padrão (*default*) ou recomendados, um programa na GCG Version 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e de pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferido quando se compara uma sequência da invenção com uma base de dados contendo um número grande de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando os parâmetros padrão (*default*). Consulte, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 e Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Cancer Res.* 25:3389-402, cada um dos quais é aqui incorporado como referências.

Ligação dependente de pH

[0066] A presente invenção inclui anticorpos anti-EGFRvIII com características de ligação dependente de pH. Por exemplo, um anticorpo anti-EGFRvIII da presente invenção pode apresentar ligação reduzida à EGFRvIII em pH ácido em comparação com pH neutro. Alternativamente, anticorpos

anti-EGFRvIII da invenção podem apresentar ligação intensificada à EGFRvIII em pH ácido em comparação com pH neutro. A expressão “pH ácido” inclui valores de pH menores que cerca de 6,2, por exemplo, cerca de 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, ou menos. Como aqui usada, a expressão “pH neutro” significa um pH de cerca de 7,0 a cerca de 7,4. A expressão “pH neutro” inclui valores de pH de cerca de 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, e 7,4.

[0067] Em determinados casos, “a ligação reduzida à EGFRvIII em pH ácido em comparação com pH neutro” é expressada em termos de uma razão entre o valor de K_D da ligação do anticorpo à EGFRvIII em pH ácido e o valor de K_D da ligação do anticorpo à EGFRvIII em pH neutro (ou vice-versa). Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode ser considerado como apresentando “ligação reduzida à EGFRvIII em pH ácido em comparação com em pH neutro” para os propósitos da presente invenção se o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo apresenta uma razão de K_D em pH ácido/ K_D em pH neutro de cerca de 3,0 ou maior. Em determinadas modalidades exemplificadoras, a razão de K_D em pH ácido/ K_D em pH neutro para um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo da presente invenção pode ser cerca de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 ou maior.

[0068] Os anticorpos com características de ligação dependente de pH podem ser obtidos, por exemplo, pela seleção de uma população de anticorpos que se ligam de modo reduzido (ou intensificado) a um antígeno específico em pH ácido em comparação com em pH neutro. Adicionalmente, modificações do domínio de ligação a antígeno no nível de aminoácido pode resultar em anticorpos com características dependentes de pH. Por exemplo,

pela substituição de um ou mais aminoácidos de um domínio que se liga ao antígeno (por exemplo, dentro de uma CDR) por um resíduo de histidina, pode ser obtido um anticorpo com ligação reduzidas ao antígeno em pH ácido em relação ao pH neutro.

Anticorpos anti-EGFRvIII compreendendo variantes de Fc

[0069] De acordo com determinadas modalidades da presente invenção, são fornecidos anticorpos anti-EGFRvIII compreendendo um domínio Fc compreendendo uma ou mais mutações que intensificam ou diminuem a ligação do anticorpo ao receptor FcRn, por exemplo, em pH ácido em comparação com em pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-EGFRvIII compreendendo uma mutação na região C_H2 ou na região C_H3 do domínio Fc, em que a(s) mutação (mutações) intensifica(m) a afinidade do domínio Fc pelo FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossoma no qual o pH está na faixa de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia-vida sérica do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitadores de tais modificações em Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e uma modificação 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254, e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação 250Q e 428L (por

exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Em ainda outra modalidade, a modificação compreende uma modificação 265A (por exemplo, D265A) e/ou uma modificação 297A (por exemplo, N297A).

[0070] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-EGFR_{vIII} compreendendo um domínio Fc compreendendo um ou mais pares ou grupos de mutações selecionados do grupo consistindo em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio Fc anteriormente mencionadas, e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo aqui descritos, são consideradas como dentro do escopo da presente invenção.

[0071] A presente invenção também inclui anticorpos anti-EGFR_{vIII} compreendendo uma região constante de cadeia pesada quimérica (C_H), em que a região quimérica C_H compreende segmentos derivados das regiões C_H de mais que um isótipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem compreender uma região quimérica C_H compreendendo parte de ou todo um domínio C_{H2} derivado de uma molécula de IgG1 humana, molécula de IgG2 humana ou molécula de IgG4 humana, combinada com parte de ou todo um domínio C_{H3} derivado de uma molécula de IgG1 humana, molécula de IgG2 humana ou molécula de IgG4 humana. De acordo com determinadas modalidades, os anticorpos da invenção compreendem uma região quimérica C_H tendo uma região de dobradiça quimérica. Por exemplo, uma dobradiça quimérica pode compreender uma sequência de aminoácidos de “dobradiça superior” (resíduos de aminoácido das posições 216 a 227 de

acordo com a numeração EU) derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humana, de uma IgG2 humana ou de uma IgG4 humana, combinada com uma sequência de “dobradiça inferior” (resíduos de aminoácido das posições 228 a 236 de acordo com a numeração EU) derivada de uma região de dobradiça de uma IgG1 humana, de uma IgG2 humana ou de uma IgG4 humana. De acordo com determinadas modalidades, a região de dobradiça quimérica compreende resíduos de aminoácido derivados de uma dobradiça superior de uma IgG1 humana ou de uma IgG4 humana e resíduos de aminoácido derivados de uma dobradiça inferior de uma IgG2 humana. Um anticorpo compreendendo uma região quimérica C_H como aqui descrito pode, em determinadas modalidades, apresentar funções efetoras de Fc modificadas sem afetar adversamente as propriedades terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo (consulte, por exemplo, Pedido Provisório U.S. nº 61/759.578, depositado em 1 de fevereiro de 2013, cuja descrição é por meio deste aqui incorporada em sua totalidade como referência).

Conjugados de anticorpo-droga (ADCs)

[0072] A presente invenção fornece conjugados de anticorpo-droga (ADCs) compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo conjugado com uma porção terapêutica como um agente citotóxico, uma droga quimioterapêutica, ou um radioisótopo.

[0073] Os agentes citotóxicos incluem qualquer agente que é prejudicial para o crescimento, a viabilidade ou a propagação de células. Exemplos de agentes citotóxicos adequados e de agentes quimioterapêuticos adequados que podem ser conjugados com os anticorpos anti-EGFRvIII de acordo com este aspecto da invenção incluem, por exemplo, hidrazida de 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanossulfonila, 1,8-di-hidroxi-biciclo[7.3.1]trideca-4,9-diene-2,6-di-ino-13-ona, 1-desidrotosterona, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 9-aminocamptotecina, actinomicina D, amanitinas, aminopterina, anguidina, antraciclina, antramicina (AMC),

auristatinas, bleomicina, bussulfano, ácido butírico, caliqueamicinas, camptotecina, carminomicinas, carmustina, cemadotinas, cisplatina, colquicina, combretastatinas, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, diacetoxipentildoxorrubicina, dibromomanitol, di-hidroxi-antracindiona, disorazóis, dolastatina, doxorrubicina, duocarmicina, equinomicinas, eleuterobinas, emetina, epotilonas, esperamicina, estramustinas, brometo de etídio, etoposídeo, fluorouracilas, geldanamicinas, gramicidina D, glicocorticoides, irinotecanos, leptomicinas, leurosinas, lidocaína, lomustina (CCNU), maitansinoides, mecloretamina, melfalano, mercatopurinas, metopterinas, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, N8-acetileespermidina, podofilotoxinas, procaína, propranolol, pteridinas, puromicina, pirrolobenzodiazepinas (PDBs), rizoxinas, estreptozotocina, talisomicinas, taxol, tenoposídeo, tetracaína, tioepa clorambucil, tomaimicinas, topotecans, tubulisina, vimblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, e derivados de qualquer um dos compostos citados acima. De acordo com determinadas modalidades, o agente citotóxico que é conjugado com um anticorpo anti-EGFRvIII é um maitansinoide como DM1 ou DM4, um derivado de tomaimicina, ou um derivado de dolastatina. Outros agentes citotóxicos conhecidos na técnica são considerados dentro do escopo da presente invenção, incluindo, por exemplo, toxinas proteicas como ricina, toxina de *C. difficile*, exotoxina de *pseudomonas*, ricina, toxina de difteria, toxina de *botulinum*, briodina, saporina, toxinas de carucu-de-cacho (isto é, fitolacatoxina e fitolacigenina), e outros como aqueles apresentados em Saphra *et al.*, *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469.

[0074] A presente invenção também inclui conjugados de anticorpo-radionuclídeo (ARCs, *Antibody-Radionuclide Conjugates*) compreendendo anticorpos anti-EGFRvIII conjugados com um ou mais radionuclídeos. Radionuclídeos exemplificadores que podem ser usados no contexto deste

aspecto da invenção incluem, mas não se limitam a, por exemplo, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra , e ^{90}Y .

[0075] Em determinadas modalidades da presente invenção, são fornecidos ADCs compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, qualquer um dentre os agentes citotóxicos descritos acima) via uma molécula ligante. Qualquer molécula ligante ou tecnologia de ligante conhecida na técnica pode ser usada para criar ou construir um ADC da presente invenção. Em determinadas modalidades, o ligante é um ligante clivável. De acordo com outras modalidades, o ligante é um ligante não clivável. Ligantes exemplificadores que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, ligantes que compreendem ou consistem em por exemplo, MC (6-maleimidocaproíla), MP (maleimidopropanoíla), val-cit (valina-citrulina), val-ala (valina- alanina), sítio de dipeptídeo em ligante clivável por protease, ala-phe (alanina-fenilalanina), sítio de dipeptídeo em ligante clivável por protease, PAB (p-aminobenziloxicarbonila), SPP (4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidila), SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de N-succinimidila), SIAB ((4-iodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidila), e suas variantes e combinações. Exemplos adicionais de ligantes que podem ser usados no contexto da presente invenção são descritos, por exemplo, em US 7.754.681 e em Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 27:5-13, e nas referências citadas nos mesmos, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[0076] A presente invenção compreende ADCs nos quais um ligante conecta um anticorpo anti-EGFRvIII ou uma molécula que se liga ao antígeno em uma droga ou uma citotoxina mediante uma ligação a um aminoácido específico dentro do anticorpo ou da molécula que se liga ao antígeno. Ligações de aminoácido exemplificadoras que podem ser usadas no contexto deste aspecto da invenção incluem, por exemplo, lisina (consulte, por

exemplo, US 5.208.020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5.714.586; US 2013/0101546; e US 2012/0585592), cisteína (consulte, por exemplo, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; e US 7.750.116), selenocisteína (consulte, por exemplo, WO 2008/122039; e Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 705:12451-12456), formilglicina (consulte, por exemplo, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110:46-51, e Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos não naturais (consulte, por exemplo, WO 2013/068874, e WO 2012/166559), aminoácidos acídicos (consulte, por exemplo, WO 2012/05982). Ligantes podem também ser conjugados com uma proteína que se liga ao antígeno via ligação a carboidratos (consulte, por exemplo, US 2008/0305497, e Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) e ligantes dissulfeto (consulte, por exemplo, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, e Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313).

[0077] Qualquer método conhecido na técnica para conjugar uma porção química com um peptídeo, polipeptídeo ou outra macromolécula pode ser usado no contexto da presente invenção para preparar um ADC anti-EGFRvIII como aqui descrito. Um método exemplificador para conjugação de anticorpo-droga via um ligante é descrito aqui no Exemplo 12. Variações neste método exemplificador serão reconhecidas pelas pessoas comumente versadas na técnica e são consideradas dentro do escopo da presente invenção.

[0078] De acordo com determinadas modalidades, a presente invenção fornece ADCs, em que um anticorpo anti-EGFRvIII como aqui descrito (por exemplo, o anticorpo designado como H1H1863N2) é conjugado com uma composição de ligante-droga como descrito em WO2014/145090 (por exemplo, composto “7”, também chamado aqui de

“M0026”), cuja descrição é por meio deste aqui incorporada em sua totalidade como referência (consulte também o Exemplo 12, aqui).

Mapeamento de epítopo e tecnologias relacionadas

[0079] O epítopo ao qual os anticorpos da presente invenção ligam-se pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos de uma proteína EGFRvIII. Alternativamente, o epítopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) de EGFRvIII. Em algumas modalidades, o epítopo está localizado no ou próximo do domínio de ligação ao ligante de EGFRvIII. Em outras modalidades, o epítopo está localizado no lado externo do domínio de ligação ao ligante de EGFRvIII, por exemplo, em uma localização sobre a superfície de EGFRvIII na qual um anticorpo, quando ligado a um tal epítopo, não interfere com a ligação do ligante à EGFRvIII.

[0080] A presente invenção, de acordo com determinadas modalidades, inclui anticorpos anti-EGFRvIII que especificamente se ligam à EGFRvIII (e não se ligam ao EGFR), em que os anticorpos reconhecem o peptídeo juncional de EGFRvIII (por exemplo, SEQ ID NO:148). Tais anticorpos podem ser aqui chamados de “ligantes ao peptídeo juncional”, “anticorpos ligantes ao peptídeo de EGFRvIII”, e semelhantes. A presente invenção, de acordo com outras modalidades, inclui anticorpos anti-EGFRvIII que especificamente se ligam à EGFRvIII (e não se ligam ao EGFR), em que os anticorpos não reconhecem o peptídeo juncional de EGFRvIII (por exemplo não reconhecem o peptídeo juncional de SEQ ID NO:148, e/ou não reconhecem o peptídeo de SEQ ID NO:165). Tais anticorpos podem ser aqui chamados de “ligantes conformacionais”, “ligantes conformacionais ao epítopo de EGFRvIII”, e semelhantes.

[0081] Várias técnicas conhecidas pelas pessoas comumente versadas na técnica podem ser usadas para determinar se um anticorpo “interage com

um ou mais aminoácidos” dentro de um polipeptídeo ou de uma proteína. Técnicas exemplificadoras incluem, por exemplo, ensaio de bloqueio cruzado rotineiro como aquele descrito em “Antibodies”, Harlow e Pista (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análise mutacional de varredura por alaninas, análise de transferências de peptídeo (*peptide blots*) (Reineke, 2004, *Methods Mol. Biol.* 248:443-463), e análise de clivagem de peptídeo. Além disso, métodos como excisão de epítipo, extração de epítipo e modificação química de antígenos podem ser utilizados (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Outro método que pode ser usado para identificar aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage é a troca de deutério por hidrogênio detectada por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de deutério por hidrogênio envolve a marcação da proteína de interesse com deutério, seguida pela ligação do anticorpo à proteína marcada com deutério. A seguir, o complexo de proteína/anticorpo é transferido para água para permitir que ocorra a troca de deutério por hidrogênio em todos os resíduos exceto nos resíduos protegidos pelo anticorpo (que permanecem marcados com deutério). Após a dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida à clivagem por protease e à análise por espectrometria de massa, descrevendo, com isso, os resíduos marcados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Consulte, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[0082] A presente invenção inclui, adicionalmente, anticorpos anti-EGFRvIII que se ligam ao mesmo epítipo que qualquer um dos anticorpos específicos exemplificadores aqui descritos (por exemplo os anticorpos compreendendo qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos apresentadas aqui na Tabela 1). Igualmente, a presente invenção também inclui anticorpos anti-EGFRvIII que competem pela ligação à EGFRvIII com

qualquer um dos anticorpos específicos exemplificadores aqui descritos (por exemplo os anticorpos compreendendo qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos apresentadas aqui na Tabela 1).

[0083] Pode-se facilmente determinar se um anticorpo liga-se ao mesmo epítopo que, ou compete pela ligação com, um anticorpo de referência anti-EGFRvIII pelo uso de métodos rotineiros conhecidos na técnica e aqui exemplificados. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo de referência anti-EGFRvIII da invenção, o anticorpo de referência é permitido ligar-se a uma proteína EGFRvIII. A seguir, é avaliada a capacidade de um anticorpo de teste para se ligar à molécula de EGFRvIII. Se o anticorpo de teste é capaz de se ligar à EGFRvIII após ligação de saturação com o anticorpo de referência anti-EGFRvIII, pode ser concluído que o anticorpo de teste se liga a um epítopo diferente do epítopo ao qual se liga o anticorpo de referência anti-EGFRvIII. Por outro lado, se o anticorpo de teste não é capaz de ligar-se à molécula de EGFRvIII após ligação de saturação com o anticorpo de referência anti-EGFRvIII, então o anticorpo de teste pode ligar-se ao mesmo epítopo que o epítopo ligado pelo anticorpo de referência anti-EGFRvIII da invenção. Experimentação rotineira adicional (por exemplo, análises de ligação e de mutação de peptídeo) pode ser então realizada para confirmar se a observada falta de ligação do anticorpo de teste é de fato devido à ligação ao mesmo epítopo que o epítopo ao qual se liga o anticorpo de referência ou se bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela falta de ligação observada. Experimentos deste tipo podem ser realizados usando ELISA, RIA, Biacore, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio qualitativo ou quantitativo de ligação de anticorpo disponível na técnica. De acordo com determinadas modalidades da presente invenção, dois anticorpos ligam-se ao mesmo epítopo (ou sobrepõem-se ao mesmo epítopo) se, por exemplo, um excesso de 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes de um anticorpo inibe a ligação do outro em pelo

menos 50% mas preferencialmente 75%, 90% ou mesmo 99% conforme medido em um ensaio de ligação competitiva (consulte, por exemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Alternativamente, é considerado que dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo se essencialmente todas as mutações de aminoácido no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro anticorpo. É considerado que dois anticorpos têm “epítomos sobrepostos” se um subconjunto das mutações de aminoácido que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro anticorpo.

[0084] Para determinar se um anticorpo compete pela ligação (ou compete cruzadamente pela ligação)) com um anticorpo de referência anti-EGFRvIII, a metodologia de ligação descrita acima é realizada em duas orientações: Em uma primeira orientação, o anticorpo de referência é permitido ligar-se a uma proteína EGFRvIII sob condições de saturação seguido pela avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula de EGFRvIII. Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste é permitido ligar-se a uma molécula de EGFRvIII sob condições de saturação seguido pela avaliação da ligação do anticorpo de referência à molécula de EGFRvIII. Se, em ambas as orientações, apenas o primeiro anticorpo (de saturação) é capaz de ligar-se à molécula de EGFRvIII, então é concluído que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência competem pela ligação à EGFRvIII. Como será reconhecido por uma pessoa versada na técnica, um anticorpo que compete pela ligação com um anticorpo de referência pode não necessariamente se ligar ao mesmo epítopo que o anticorpo de referência, mas pode estericamente bloquear a ligação do anticorpo de referência pela ligação a um epítopo adjacente ou sobreposto.

Preparação de anticorpos humanos

[0085] Os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção podem ser anticorpos completamente humanos. Métodos de gerar anticorpos

monoclonais, incluindo anticorpos monoclonais completamente humanos são conhecidos na técnica. Qualquer um de tais métodos conhecidos pode ser usado no contexto da presente invenção para preparar anticorpos humanos que especificamente se ligam à EGFRvIII humana.

[0086] Com o uso da tecnologia VELOCIMMUNE™, por exemplo, ou de qualquer outro método similar conhecido para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos, anticorpos quiméricos de alta afinidade por EGFRvIII são inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Conforme na seção experimental abaixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados de acordo com características desejáveis, incluindo afinidade, atividade de bloqueio de ligante, seletividade, epítipo, etc. Se necessário, as regiões constantes de camundongo são substituídas por uma região constante humana desejada, por exemplo IgG1 ou IgG4 modificada ou de tipo selvagem, para gerar um anticorpo completamente humano anti-EGFRvIII. Embora a região constante selecionada possa variar de acordo com o uso específico, as características de especificidade pelo alvo e de ligação a antígeno de alta afinidade residem na região variável. Em determinados casos, os anticorpos completamente humanos anti-EGFRvIII são isolados diretamente de células-B positivas para antígeno.

Bioequivalentes

[0087] Os anticorpos anti-EGFRvIII e os fragmentos de anticorpo anti-EGFRvIII da presente invenção incluem proteínas tendo sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos descritos, mas que mantêm a capacidade para se ligarem à EGFRvIII humana. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpo variantes compreendem uma ou mais adições, deleções, ou substituições de aminoácidos quando comparados com a sequência parental, mas apresentam atividade biológica que é essencialmente equivalente àquela dos anticorpos descritos. Igualmente, as sequências de

DNA que codificam o anticorpo anti-EGFRvIII da presente invenção incluem sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções, ou substituições de nucleotídeos quando comparadas com a sequência descrita, mas que codificam um anticorpo anti-EGFRvIII ou fragmento de anticorpo anti-EGFRvIII que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo anti-EGFRvIII ou fragmento de anticorpo anti-EGFRvIII da invenção. Exemplos de tais sequências de aminoácidos variantes e sequências de DNA variantes são discutidos abaixo.

[0088] Dois anticorpos de ligação a antígeno, ou duas proteínas de ligação a antígeno, são considerados (consideradas) bioequivalentes se, por exemplo, são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cujas taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administrados na mesma dose molar sob condições experimentais similares, quer dose única quer múltiplas doses. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuticas se são equivalentes na extensão de sua absorção mas não na sua taxa de absorção e ainda podem ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na marcação, não são essenciais para a obtenção de concentrações de droga corporais efetivas durante, por exemplo, uso crônico, e são considerados medicamente insignificantes para o produto farmacêutico específico estudado.

[0089] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se não houver diferenças clinicamente significativas em suas segurança, pureza e potência.

[0090] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se um paciente puder ser mudado uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento previsto no risco para efeitos adversos, incluindo uma alteração clinicamente significativa em imunogenicidade, ou efetividade diminuída, em comparação com a terapia

continuada sem tal mudança.

[0091] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se ambas atuarem por um mecanismo comum ou mecanismos comuns de ação para a condição ou as condições de uso, na medida em que tais mecanismos sejam conhecidos.

[0092] Bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e *in vitro*. As medições de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou de seus metabólitos é medida no sangue, no plasma, no soro, ou em outro fluido biológico como uma função do tempo; (b) um teste *in vitro* que tem sido correlacionado com e é razoavelmente preditivo de dados de biodisponibilidade humana *in vivo*; (c) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos em que o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou de seu alvo) é medido como uma função do tempo; e (d) em um teste clínico bem controlado que estabelece a segurança, a eficácia, ou a biodisponibilidade ou a bioequivalência de um anticorpo.

[0093] As variantes bioequivalente de anticorpos anti-EGFRvIII da invenção podem ser construídas, por exemplo, pela realização de várias substituições de resíduos ou sequências ou deleção de resíduos internos ou terminais ou de sequências internas ou terminais não necessários (não necessárias) para a atividade biológica. Por exemplo, resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser deletados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas após renaturação. Em outros contextos, os anticorpos bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpo anti-EGFRvIII compreendendo alterações de aminoácido que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

Seletividade para espécie e reatividade cruzada entre espécies

[0094] A presente invenção, de acordo com determinadas modalidades, fornece anticorpos anti-EGFRvIII que se ligam à EGFRvIII humana, mas não à EGFRvIII de outra espécie. A presente invenção também inclui anticorpos anti-EGFRvIII que se ligam à EGFRvIII humana e à EGFRvIII de uma ou mais espécies não humanas. Por exemplo, os anticorpos anti-EGFRvIII da invenção podem liga-se à EGFRvIII humana e podem ou não se ligar, conforme for o caso, a uma ou mais EGFRvIII de camundongo, rato, porquinho-da-índia, hamster, gerbo, porco, gato, cão, coelho, cabra, ovelha/carneiro, vaca, cavalo, camelo, macaco cinomolgo, sagui, reso ou chimpanzé. De acordo com determinadas modalidades exemplificadoras da presente invenção, são fornecidos anticorpos anti-EGFRvIII que especificamente se ligam à EGFRvIII humana e à EGFRvIII de macaco cinomolgo (por exemplo, *Macaca fascicularis*) EGFRvIII. Outros anticorpos anti-EGFRvIII da invenção ligam-se à EGFRvIII humana, mas não se ligam à, ou se ligam apenas fracamente à, EGFRvIII de macaco cinomolgo.

Anticorpos multiespecíficos

[0095] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecífico). Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epítomos diferentes de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínio de ligação a antígeno específicos para mais que um polipeptídeo alvo. Consulte, por exemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção podem ser ligados à ou coexpressados com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou outra proteína. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, como outro anticorpo ou fragmento de anticorpo para produzir um anticorpo biespecífico ou multiespecífico com

uma segunda especificidade de ligação.

[0096] A presente invenção inclui anticorpos biespecíficos em que um braço de uma imunoglobulina liga-se à EGFRvIII humana, e o outro braço da imunoglobulina é específico para um segundo antígeno. O braço de ligação à EGFRvIII pode compreender qualquer uma dentre as sequências de HCVR/LCVR ou CDR apresentadas aqui na Tabela 1. Em determinadas modalidades, o braço de ligação à EGFRvIII liga-se à EGFRvIII humana e bloqueia a ligação de ligante à EGFRvIII. Em outras modalidades, o braço de ligação à EGFRvIII liga-se à EGFRvIII, mas não bloqueia a ligação de ligante à EGFRvIII.

[0097] Um formato de anticorpo biespecífico exemplificador que pode ser usado no contexto da presente invenção envolve a utilização de um primeiro domínio C_H3 de imunoglobulina (Ig) e um segundo domínio C_H3 de Ig, em que os primeiro e segundo domínios C_H3 de Ig diferem um do outro em pelo menos um aminoácido, e em que a diferença de pelo menos um aminoácido reduz a ligação do anticorpo biespecífico à Proteína A em comparação com um anticorpo biespecífico isento da diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio C_H3 de Ig liga-se à Proteína A e o segundo domínio C_H3 de Ig contém uma mutação que reduz ou elimina a ligação à Proteína A como uma modificação H95R (por numeração de éxons de acordo com IMGT; H435R por numeração EU). O segundo domínio C_H3 pode compreender, adicionalmente, uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Outras modificações que podem ser encontradas dentro do segundo domínio C_H3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (por IMGT; D356E, L358M], N384S, K392N, V397M], e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG1; N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N, e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M), R69K, E79Q e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M], R409K, E419Q, e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG4. Variações no

formato de anticorpo biespecífico descrito acima são consideradas dentro do escopo da presente invenção.

[0098] Outros formatos biespecíficos exemplificadores que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos de diacorpo ou baseados em scFv, fusões de IgG-scFv, domínio variável dual (DVD)-Ig, *Quadroma*, *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com *knobs-into-holes*, etc.), *Crosstab*, *CrossFab*, *(SEED)body*, zíper de leucina, *Duobody*, IgG1/IgG2, Fab de ação dual (DAF)-IgG, e formatos biespecíficos Mab² (consulte, por exemplo, Klein *et al.* 2012, *mAbs* 4:6, 1-11, e as referências citadas no mesmo, para uma análise dos formatos citados anteriormente). Os anticorpos biespecíficos podem também ser construídos usando conjugação de peptídeo/ácido nucleico, por exemplo, em que aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são usados para gerar conjugados de anticorpo-oligonucleotídeo sítio-específicos que então se automontam em complexos multiméricos com composição, valência e geometria definidas. (Consulte, por exemplo, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2072]).

Formulação terapêutica e administração

[0099] A invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos anti-EGFRvIII ou seus fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção. As composições farmacêuticas da invenção são formuladas com carreadores, excipientes, e outros agentes adequados que fornecem transferência, liberação, tolerância melhoradas, e semelhantes. Uma multiplicidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos farmacêuticos: “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, unguentos, geleias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídio (catiônicas ou aniônicas) (como

LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões de óleo-em-água e de água-em-óleo, emulsões de carbowax (poli(glicóis etilênicos de vários pesos moleculares), géis semissólidos, e misturas semissólidas contendo carbowax. Consulte também Powell *et al.* “Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA (1998) *J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311.

[00100] A dose de anticorpo administrada a um paciente pode variar dependendo da idade e do tamanho do paciente, da doença alvo, das condições, da rota de administração, e semelhantes. A dose preferida é tipicamente calculada de acordo com o peso corporal ou a área superficial corporal. Em um paciente adulto, pode ser vantajoso administrar intravenosamente o anticorpo da presente invenção normalmente em uma dose única de cerca de 0,01 a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente de cerca de 0,02 a cerca de 7, de cerca de 0,03 a cerca de 5, ou de cerca de 0,05 a cerca de 3 mg/kg de peso corporal. Dependendo da severidade da condição, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. As tabelas de horários e dosagens efetivas para administrar os anticorpos anti-EGFRvIII podem ser determinadas empiricamente; por exemplo, o progresso do paciente pode ser monitorado por avaliação periódica, e a dose pode ser ajustada de acordo com a avaliação. Além disso, a graduação das dosagens interespécies pode ser realizada usando métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00101] Vários sistemas de liberação são conhecidos e podem ser usados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, endocitose mediada por receptor (consulte, por exemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Métodos de introdução incluem, mas não se limitam a, rotas

intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. A composição pode ser administrada por qualquer rota conveniente, por infusão ou injeção de bolo, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosas retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada junta com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local.

[00102] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser liberada subcutânea ou intravenosamente com uma seringa padrão e uma agulha padrão. Além disso, em relação à liberação subcutânea, um dispositivo de caneta de liberação facilmente tem aplicações em liberação de uma composição farmacêutica da presente invenção. Um tal dispositivo de caneta de liberação pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de caneta de liberação reutilizável de modo geral utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Quando toda a composição farmacêutica dentro do cartucho foi administrada e o cartucho está vazio, o cartucho vazio pode ser facilmente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de caneta de liberação pode ser então usado de novo. Em um dispositivo de caneta de liberação descartável, não há cartucho substituível. Em vez disto, o dispositivo de caneta de liberação descartável é recebido preenchido com a composição farmacêutica mantida dentro de um reservatório dentro do dispositivo. Quando o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, o dispositivo inteiro é descartado.

[00103] Numerosos dispositivos de caneta de liberação e de liberação com autoinjeter têm aplicações na liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Exemplos incluem, mas não se limitam a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, caneta HUMALIN

70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIORS (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha), apenas para citar alguns. Exemplos de dispositivos de caneta de liberação descartáveis tendo aplicações em liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas não se limitam a, caneta SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), a caneta FLEXPEN™ (Novo Nordisk), a caneta KWIKPEN™ (Eli Lilly), o autoinjeter SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA), a caneta PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemanha), a caneta EPIPEN™ (Dey, L.P.), e a caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), apenas para citar alguns.

[00104] Em determinadas situações, a composição farmacêutica pode ser liberada em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada (consulte Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser utilizados; consulte, “Medical Applications of Controlled Release”, Langer e Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser posicionado na proximidade do alvo da composição, exigindo dessa forma apenas uma fração da dose sistêmica (consulte, por exemplo, Goodson, 1984, em “Medical Applications of Controlled Release”, *supra*, vol. 2, pp. 115-138). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na análise por Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

[00105] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosa, subcutânea, intracutânea e intramuscular, infusões por gotejamento, etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis

podem ser preparadas, por exemplo, por dissolução, suspensão ou emulsificação do anticorpo ou de seu sal descrito acima em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso convencionalmente usado para injeções. Como o meio aquoso para injeções, há, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica contendo glicose e outros agentes auxiliares, etc., que pode ser usada em combinação com um agente solubilizante adequado como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, glicol propilênico, poli(glicol etilênico)), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (aduto de polioxietileno-(50 mols)-de-óleo de rícino hidrogenado)], etc. Como o meio oleoso, são utilizados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de feijão-soja, etc., que podem ser utilizados em combinação com um agente solubilizante como benzoato de benzila, álcool benzílico, etc. Uma ampola apropriada é preferencialmente cheia com a injeção preparada dessa forma.

[00106] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas como formas de dosagem em uma dose unitária adequada para ajustar uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, etc. A quantidade do anticorpo anteriormente mencionado contido é, de modo geral, de cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente sob a forma de injeção, é preferido que o anticorpo anteriormente mencionado esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para outras formas de dosagem.

Usos terapêuticos dos anticorpos

[00107] A presente invenção inclui métodos compreendendo administrar a um indivíduo que necessita da mesma uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII ou um conjugado de anticorpo-droga compreendendo um anticorpo anti-EGFRvIII (por

exemplo, um anticorpo anti-EGFRvIII ou ADC compreendendo qualquer uma dentre as sequências de HCVR/LCVR ou CDR como apresentadas aqui na Tabela 1). A composição terapêutica pode compreender qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII, ou seus fragmentos de ligação a antígeno, ou ADCs aqui descritos, e um diluente ou carreador farmacologicamente aceitável.

[00108] Os anticorpos e ADCs da invenção são úteis, *inter alia*, para tratamento, a prevenção e/ou a melhoria de qualquer doença ou distúrbio associada com (associado com) ou mediada pela (mediado pela) atividade ou expressão de EGFRvIII, ou tratável pelo bloqueio da interação entre e EGFRvIII e um ligante de EGFR ou diferentemente pela inibição da atividade e/ou sinalização de EGFRvIII, e/ou estimulação de internalização de receptor e/ou decréscimo do número de receptores em superfície de célula. Por exemplo, os anticorpos e ADCs da presente invenção são úteis para tratamento de tumores que expressam EGFRvIII e/ou que respondem à sinalização mediada por ligante. Os anticorpos e os fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção podem também ser usados para tratar tumores primários e/ou metastáticos que ocorrem no cérebro e nas meninges, em orofaringe, pulmão e árvore bronquial, trato gastrointestinal, tratos reprodutivos masculino e feminino, músculo, osso, pele e apêndices, tecido conjuntivo, baço, sistema imune, células formadoras de sangue e medula óssea, fígado e trato urinário, e órgãos sensoriais especiais como o olho. Em determinadas modalidades, os anticorpos e ADCs da invenção são usados para tratar um ou mais dentre os seguintes cânceres: carcinoma de célula renal, carcinoma pancreático, câncer de cabeça e pescoço, câncer de próstata, gliomas malignos, osteossarcoma, câncer colorretal, câncer gástrico (por exemplo, câncer gástrico com amplificação MET), mesotelioma maligno, mieloma múltiplo, câncer ovariano, câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, sarcoma sinovial, câncer de tireoide,

câncer de mama, ou melanoma.

[00109] No contexto dos métodos de tratamento aqui descritos, o anticorpo anti-EGFRvIII pode ser administrado como uma monoterapia (isto é, como o único agente terapêutico) ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais (cujos exemplos são descritos aqui em outro lugar).

[00110] De acordo com modalidades específicas, a presente invenção fornece métodos para tratar um câncer, reduzir crescimento de tumor e/ou causar regressão de tumor em um paciente. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem administrar a um paciente um primeiro conjugado de anticorpo-droga (ADC) quer sozinho quer em combinação com um segundo anticorpo anti-EGFRvIII ou ADC. O primeiro ADC tipicamente compreenderá um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo e uma citotoxina, em que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do primeiro ADC especificamente se liga às EGFRvIII, mas não se liga ao peptídeo juncional de EGFRvIII de SEQ ID NO:148 ou ao peptídeo de SEQ ID NO:165 (isto é, o primeiro ADC compreende um anticorpo conformacional de ligação à EGFRvIII). Em modalidades nas quais um segundo anticorpo ou ADC é administrado, o segundo anticorpo ou ADC tipicamente compreenderá um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo e uma citotoxina, em que o segundo anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno especificamente se liga à EGFRvIII e também se liga ao peptídeo juncional de EGFRvIII de SEQ ID NO:148 e/ou ao peptídeo de SEQ ID NO:165 (isto é, o segundo anticorpo ou ADC compreende um anticorpo de ligação ao peptídeo juncional de EGFRvIII). Quando dois ADCs anti-EGFRvIII separados são usados no contexto deste aspecto da invenção, ambos os ADCs podem, em determinadas modalidades, compreender idêntico agente citotóxico ou a mesma classe de agente citotóxico. Em outras modalidades nas quais dois ADCs anti-EGFRvIII separados são usados, cada

ADC pode compreender um agente citotóxico diferente e/ou uma classe diferente de agente citotóxico. Modalidades exemplificadoras não limitadoras deste aspecto da invenção são aqui descritas no Exemplo 14. De acordo com determinadas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do primeiro ADC (isto é, o anticorpo conformacional de ligação à EGFRvIII) compreende regiões determinantes complementaridade de cadeias pesadas e leves compreendendo SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 44, 46, e 48, ou a região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 34 e um região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:42.

Terapia de combinação e formulações

[00111] A presente invenção inclui composições e formulações terapêuticas compreendendo qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII aqui descritos em combinação com um ou mais componentes terapeuticamente ativos adicionais, e métodos de tratamento compreendendo administrar tais combinações aos indivíduos que necessitam das mesmas.

[00112] Os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção podem ser coformulados com e/ou administrados em combinação com um ou mais componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional (adicionais), selecionado(s) do grupo consistindo em: um antagonista de PRLR (por exemplo, um anticorpo anti-PRLR ou um inibidor molecular pequeno de PRLR), um antagonista de EGFR (por exemplo, um anticorpo anti-EGFR [por exemplo, cetuximab ou panitumumab] ou inibidor molecular pequeno de EGFR [por exemplo, gefitinib ou erlotinib]), um antagonista de outro membro da família de EGFR como Her2/ErbB2, ErbB3 ou ErbB4 (por exemplo, anti-ErbB2 [por exemplo, trastuzumab ou T-DM1 {KADCYLA®}], anticorpo anti-ErbB3 ou anti-ErbB4 ou inibidor molecular pequeno de atividade de ErbB2, ErbB3 ou ErbB4), um antagonista de cMET (por exemplo, um anticorpo anti-cMET), um antagonista de IGF1R (por exemplo, um anticorpo anti-IGF1R), um inibidor de B-raf (por exemplo, vemurafenib, sorafenib,

GDC-0879, PLX-4720), um inibidor de PDGFR- α (por exemplo, um anticorpo anti-PDGFR- α), um inibidor de PDGFR- β (por exemplo, um anticorpo anti-PDGFR- β ou inibidor molecular pequeno de quinase como, por exemplo, mesilato de imatinib ou malato de sunitinib), um inibidor de ligante de PDGF (por exemplo, anticorpo anti-PDGF-A, -B, -C, ou -D, aptâmero, siRNA, etc.), um antagonista de VEGF (por exemplo, um VEGF-Trap como aflibercept, consulte, por exemplo, US 7.087.411 (também chamado aqui de uma “proteína de fusão inibidora de VEGF”), anticorpo anti-VEGF (por exemplo, bevacizumab), um inibidor molecular pequeno de quinase de receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib ou pazopanib)), um antagonista de DLL4 (por exemplo, um anticorpo anti-DLL4 descrito em US 2009/0142354 como REGN421), um antagonista de Ang2 (por exemplo, um anticorpo anti-Ang2 descrito em US 2011/0027286 como H1H685P), um antagonista de FOLH1 (por exemplo, um anticorpo anti-FOLH1), um antagonista de STEAP1 ou STEAP2 (por exemplo, um anticorpo anti-STEAP1 ou um anticorpo anti-STEAP2), um antagonista de TMPRSS2 (por exemplo, um anticorpo anti-TMPRSS2), um antagonista de MSLN (por exemplo, um anticorpo anti-MSLN), um antagonista de CA9 (por exemplo, um anticorpo anti-CA9), um antagonista de uroplakin (por exemplo, um anticorpo anti-uroplakin [por exemplo, anticorpo anti-UPK3A], um antagonista de MUC16 (por exemplo, um anticorpo anti-MUC16), um antagonista de antígeno Tn (por exemplo, um anticorpo anti-Tn), um antagonista de CLEC12A (por exemplo, um anticorpo anti-CLEC12A), um antagonista de TNFRSF17 (por exemplo, um anticorpo anti-TNFRSF17), um antagonista de LGR5 (por exemplo, um anticorpo anti-LGR5), um antagonista monovalente de CD20 (por exemplo, um anticorpo monovalente anti-CD20 como rituximab), um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anticorpo anti-CD3, um anticorpo anti-CTLA-4 etc. Outros agentes que podem ser benéficamente administrados em combinação com as

moléculas biespecíficas de ligação a antígeno da invenção incluem, por exemplo, tamoxifeno, inibidores de aromatase, e inibidores de citocina, incluindo inibidores moleculares pequenos de citocina e anticorpos que se ligam às citocinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, ou aos seus respectivos receptores.

[00113] A presente invenção inclui composições e formulações terapêuticas compreendendo qualquer um dentre os anticorpos anti-EGFRvIII aqui descritos em combinação com um ou mais agentes quimioterapêuticos. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes como tiotepa e ciclofosfamida (CytosanTM); sulfonatos de alquila como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolmelamina; mostardas de nitrogênio como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabólitos como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina,

6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgênios como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitioetano, testolactona; antiadrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; agente reabastecedor de ácido fólico como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida-glicosídeo; ácido aminolevulínico; ansacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinana; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; PSKTM; razoxana; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por exemplo paclitaxel (TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e docetaxel (TaxotereTM; Aventis Antony, França); clorambucil; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina como cisplatina e carboplatina; vimblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidores de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um(a) citado (citada) acima. Também estão incluídos nesta definição os agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação hormonal sobre tumores como antiestrogênios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazóis inibidores de aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY 117018, onapristona, e toremifeno (Fareston); e antiandrogênios como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de

qualquer um(a) citado (citada) acima.

[00114] Os anticorpos anti-EGFRvIII da invenção podem também ser administrados e/ou coformulados em combinação com antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, esteroides, oxigênio, antioxidantes, inibidores de COX, cardioprotetores, agentes quelantes de metais, IFN-gama e/ou NSAIDs.

[00115] O(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional (adicional), por exemplo, qualquer um dentre os agentes listados acima ou seus derivados, pode(m) ser administrado(s) imediatamente antes da, juntamente com a, ou pouco depois da administração de um anticorpo anti-EGFRvIII da presente invenção; (para os propósitos da presente descrição, tais regimes de administração são considerados a administração de um anticorpo anti-EGFRvIII “em combinação com” um componente terapeuticamente ativo adicional). A presente invenção inclui composições farmacêuticas nas quais um anticorpo anti-EGFRvIII da presente invenção é coformulado com um ou mais dentre o(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional (adicional) conforme aqui descrito em outro lugar.

Regimes de administração

[00116] De acordo com determinadas modalidades da presente invenção, doses múltiplas de um anticorpo anti-EGFRvIII (ou de uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo anti-EGFRvIII e qualquer um dentre os agentes terapeuticamente ativos aqui mencionados) podem ser administradas a um indivíduo durante um período de tempo determinado. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem sequencialmente administrar a um indivíduo doses múltiplas de um anticorpo anti-EGFRvIII da invenção. Como aqui usado, “sequencialmente administrar” significa que cada dose de anticorpo anti-EGFRvIII é administrada ao indivíduo em um instante de tempo diferente, em dias diferentes separados por um intervalo predeterminado (por exemplo,

horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos que compreendem sequencialmente administrar ao paciente uma dose única inicial de um anticorpo anti-EGFRvIII, seguida por uma ou mais doses secundárias do anticorpo anti-EGFRvIII, e opcionalmente seguidas por uma ou mais doses terciárias do anticorpo anti-EGFRvIII.

[00117] Os termos “dose inicial”, “doses secundárias”, e “doses terciárias”, referem-se à sequência temporal de administração do anticorpo anti-EGFRvIII da invenção. Dessa forma, a “dose inicial” é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também chamada de a “dose de linha base”); as “doses secundárias” são as doses que são administradas após a dose inicial; e as “doses terciárias” são as doses que são administradas após as doses secundárias. Todas as doses iniciais, secundárias, e terciárias podem conter a quantidade igual de anticorpo anti-EGFRvIII, mas de modo geral podem diferir umas das outras em termos de frequência de administração. Em determinadas modalidades, entretanto, a quantidade de anticorpo anti-EGFRvIII contida nas doses inicial, secundárias e/ou terciárias varia de uma para as outras (por exemplo, ajustada para cima ou para baixo se apropriado) durante o curso do tratamento. Em determinadas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como “doses de carregamento” seguidas por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, “doses de manutenção”).

[00118] Em determinadas modalidades exemplificadoras da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada 1 a 26 (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, ou mais) semanas após a dose imediatamente precedente. A frase “a dose imediatamente precedente”, como aqui usada, significa, em uma

sequência de administrações múltiplas, a dose de anticorpo anti-EGFRvIII que é administrada a um paciente antes da administração da dose seguinte mais próxima na sequência sem doses interpostas.

[00119] Os métodos de acordo com este aspecto da invenção podem compreender administrar a um paciente qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de um anticorpo anti-EGFRvIII. Por exemplo, em determinadas modalidades, apenas uma única dose secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) doses secundárias são administradas ao paciente. Igualmente, em determinadas modalidades, apenas uma única dose terciária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou more) doses terciárias são administradas ao paciente. O regime de administração pode ser realizado durante o tempo de vida de um indivíduo específico, ou até que tal tratamento não seja mais terapeuticamente necessário ou vantajoso.

[00120] Em modalidades envolvendo múltiplas doses secundárias, cada dose secundária pode ser administrada na frequência igual à frequência das outras doses secundárias. Por exemplo, cada dose secundária pode ser administrada ao paciente 1 a 2 semanas ou 1 a 2 meses após a dose imediatamente precedente. Similarmente, em modalidades envolvendo múltiplas doses terciárias, cada dose terciária pode ser administrada na frequência igual à frequência das outras doses terciárias. Por exemplo, cada dose terciária pode ser administrada ao paciente 2 a 12 semanas após a dose imediatamente precedente. Em determinadas modalidades da invenção, a frequência na qual as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente podem variar no decorrer do curso do regime de tratamento. A frequência de administração pode também ser ajustada durante o curso de tratamento por um médico dependendo das necessidades do paciente individual após exame clínico.

[00121] A presente invenção inclui regimes de administração nos quais 2 a 6 doses de carregamento são administradas a um paciente em uma primeira frequência (por exemplo, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, etc.), seguidas pela administração de duas ou mais doses de manutenção ao paciente em uma base menos frequente. Por exemplo, de acordo com este aspecto da invenção, se as doses de carregamento são administradas em uma frequência de uma vez por mês, então as doses de manutenção podem ser administradas ao paciente uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, etc.

Usos diagnósticos dos anticorpos

[00122] Os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção podem também ser usados para detectar e/ou medir EGFRvIII, ou células que expressam EGFRvIII em uma amostra, por exemplo, para propósitos diagnósticos. Por exemplo, um anticorpo anti-EGFRvIII, ou fragmento do mesmo, pode ser usado para diagnosticar uma condição ou doença caracterizada pela expressão aberrante (por exemplo, superexpressão, subexpressão, falta de expressão) de EGFRvIII. Ensaios diagnósticos exemplificadores para EGFRvIII podem compreender, por exemplo, contatar uma amostra, obtida de um paciente, com um anticorpo anti-EGFRvIII da invenção, em que o anticorpo anti-EGFRvIII está marcado com um marcador detectável ou uma molécula repórter. Alternativamente, um anticorpo anti-EGFRvIII não marcado pode ser usado em aplicações diagnósticas em combinação com um anticorpo secundário que está, ele mesmo, detectavelmente marcado. O marcador detectável ou a molécula repórter pode ser um radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I ; uma porção fluorescente ou quimioluminescente como isotiocianato de fluoresceína, ou rodamina; ou uma enzima como fosfatase alcalina, beta-galactosidase, peroxidase de rábano, ou luciferase. Ensaios exemplificadores específicos que podem ser

usados para detectar ou medir EGFRvIII em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), radioimunoensaio (RIA, *RadioImmunoAssay*), e separação de células ativadas por fluorescência (FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*).

[00123] As amostras que podem ser usadas em ensaios diagnósticos de EGFRvIII de acordo com a presente invenção incluem qualquer amostra de tecido ou de fluido obtível de um paciente que contém quantidades detectáveis de proteína EGFRvIII, ou de seus fragmentos, sob condições normais ou patológicas. De modo geral, os teores de EGFRvIII em uma amostra específica obtida de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não afligido com uma doença ou condição associada com atividade anormal ou teores anormais de EGFRvIII) serão medidos para inicialmente estabelecer um teor de linha base, ou padrão, de EGFRvIII. Este teor de linha base de EGFRvIII pode então ser comparado com os teores de EGFRvIII medidos em amostras obtidas de indivíduos suspeitos em ter uma doença ou condição relacionada com EGFRvIII.

EXEMPLOS

[00124] Os seguintes exemplos são descritos adiante de modo a fornecerem àquelas pessoas comumente versadas na técnica uma descrição ou descrição completa de como preparar e usar os métodos e as composições da invenção, e não são pretendidos para limitarem o escopo do que os inventores consideram como a invenção deles. Têm sido realizados esforços para garantir acurácia em relação aos números utilizados mas devem ser considerados alguns erros e desvios experimentais. Salvo indicação em contrário, o peso molecular é peso molecular médio, a temperatura é em graus Centígrados, e a pressão é a pressão atmosférica ou próxima da pressão atmosférica.

Exemplo 1. Geração de anticorpos anti-EGFRvIII

[00125] Anticorpos anti-EGFRvIII foram obtidos por imunização de

um camundongo VELOCIMMUNE™ (isto é, um camundongo modificado compreendendo DNA que codifica as regiões variáveis de cadeias leves kappa e pesadas de imunoglobulina humana) com um imunógeno compreendendo o domínio extracelular de EGFRvIII. Os anticorpos do primeiro conjunto incluem os anticorpos designados como H1H2194P, H1H2195P, H2M1863N2, H2M1911N, H2M1912N, H2M1915N, H2M1917N, H2M1918N e H3M1913N (conforme mostrados nas Tabelas 1 e 2).

[00126] A resposta imune do anticorpo foi monitorada por um imunoenensaio específico para EGFRvIII. Quando uma resposta imune desejada foi alcançada, esplenócitos foram colhidos e fusionados com células de mieloma de camundongo para preservar sua viabilidade e formar linhagens de célula de hibridoma. As linhagens de célula de hibridoma foram testadas e selecionadas para identificar as linhagens celulares que produzem anticorpos específicos para EGFRvIII. Com o uso desta técnica foram obtidos vários anticorpos quiméricos anti-EGFRvIII (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo). Além disso, foram isolados vários anticorpos anti-EGFRvIII completamente humanos diretamente das células-B positivas para antígeno sem fusão em células de mieloma, conforme descrito em US 2007/0280945A1.

[00127] Separadamente, H1H1863N2 com fucosilação reduzida ["H1H1863N2(Fuc-)"] foi também preparado em uma linhagem de célula hospedeira de CHO (*Chinese Hamster Ovary*, ovário de hamster chinesa) que foi descrita como "8088" em Pedido de Patente US nº 2010/0304436A1, que é especificamente aqui incorporado em sua totalidade como referência. Resumidamente, as sequências de cadeia leve e de cadeia pesada de H1H1863N2 foram clonadas em vetores de expressão. Dois milhões de células 8088 foram transferidos com os plasmídeos de cadeias leve e pesada, e o vetor pR4004 contendo o gene que codifica Cre. As células transfectadas que sobreviveram à seleção com 400 µg/mL de higromicina foram adaptadas

para crescimento em suspensão em meio isento de fucose, isento de soro. As células que expressaram a proteína fluorescente EGFP mas não DsRed ou ECFP das células transfectadas foram isoladas por citometria de fluxo. As células separadas foram semeadas em um frasco agitador a 4×10^5 células/mL e, três dias mais tarde, o meio de cultura foi coletado e a proteína anticorpo dentro do mesmo [isto é, H1H1863N2(Fuc-)] foi purificada por cromatografia em Proteína A. Análise por espectrometria de massa do H1H1863N2(Fuc-) resultante confirmou que a fucose de núcleo foi removida em relação ao anticorpo original H1H1863N2(Fuc+). Ambas as designações aqui, “H1H1863N2” e “H1H1863N2(Fuc+)”, indicam o anticorpo original sem modificações por fucosilação.

[00128] Determinadas propriedades biológicas dos anticorpos anti-EGFRvIII exemplificadores gerados com os métodos deste Exemplo são descritas em detalhe nos Exemplos descritos abaixo.

Exemplo 2. Sequências de aminoácidos e de ácido nucleico de regiões variáveis de cadeias leves e pesadas

[00129] A Tabela 1 apresenta os identificadores de sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeias pesadas e leves e CDRs de anticorpos anti-EGFRvIII selecionados da invenção. Os identificadores de sequências de ácido nucleico correspondentes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Identificadores de Sequências de Aminoácidos

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

Tabela 2: Identificadores de Sequências de Ácido Nucleico

Designação de Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15

H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

[00130] Os anticorpos são tipicamente aqui nomeados de acordo com a seguinte nomenclatura: prefixo Fc (por exemplo “H1H”, “H2M”, “H3M”, etc.), seguido por um identificador numérico (por exemplo “2194”, “2195”, “1863”, etc.), seguido por um sufixo “P” ou “N”, conforme mostrado nas Tabelas 1 e 2. Dessa forma, de acordo com esta nomenclatura, um anticorpo pode ser aqui nomeado, por exemplo, como “H1H2194N”, “H2M1911N”, “H3M1913N”, etc. Os prefixos H1H, H2M e H3M na designação de anticorpos aqui usada indicam o isótipo de região Fc específico do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo “H1H” tem um Fc de IgG1 humana, um anticorpo “H2M” tem um Fc de IgG2 de camundongo, e um anticorpo “H3M” tem um Fc de IgG3 de camundongo, (todas as regiões variáveis são completamente humanas conforme denotadas pelo primeiro 'H' na designação de anticorpo). Como será reconhecido por uma pessoas comumente versadas na técnica, um anticorpo tendo um isótipo Fc específico pode ser convertido em um anticorpo com um isótipo Fc diferente (por exemplo, um anticorpo com um Fc de IgG1 de camundongo pode ser convertido em um anticorpo com [um Fc] de IgG4 humana, etc.), mas em qualquer caso, os domínios variáveis (incluindo as CDRs) – que são indicados pelos identificadores numéricos mostrados nas Tabelas 1 e 2 – permanecerão os mesmos, e é previsto que as propriedades de ligação são idênticas ou substancialmente similares independente da natureza do domínio Fc.

Constructos de controle nos exemplos seguintes

[00131] Os constructos de controle foram incluídos nos experimentos seguintes para propósitos comparativos: Controle I: Anticorpo humano (IgG1) anti-EGFRvIII com domínios variáveis de cadeias pesadas e leves tendo as

sequências de aminoácidos correspondendo às SEQ ID NOS:142 e 144, respectivamente, do anticorpo “13.1.2” descrito em Patente U.S. nº 7.736.644; Controle II: Anticorpo quimérico (hIgG1) anti-EGFRvIII com domínios variáveis de cadeias pesadas e leves tendo as sequências de aminoácidos correspondendo às SEQ ID NOS:11 e 12, respectivamente, do anticorpo “ch806” descrito em Patente U.S. nº 7.589.180; Controle III: Anticorpo humanizado (hIgG1) anti-EGFRvIII com domínios variáveis de cadeias pesadas e leves tendo as sequências de aminoácidos correspondendo às SEQ ID NOS:42 e 47, respectivamente, do anticorpo “hu806” descrito em Publicação de Pedido de Patente U.S. nº 2010/0056762; Controle IV: um anticorpo quimérico anti-EGFR com domínios variáveis de cadeias pesadas e leves tendo as sequências de aminoácidos dos domínios correspondentes de “C225”, conforme apresentado em US 7.060.808; e Controle V: Anticorpo humano (IgG1) anti-EGFRvIII com domínios variáveis de cadeias pesadas e leves tendo as sequências de aminoácidos correspondendo às SEQ ID NOS: 2 e 19, respectivamente, do anticorpo “131” de Patente U.S. nº 7.736.644 B2. É sabido que o anticorpo “13.1.2” é específico para o peptídeo juncional (SEQ ID NO:148) de EGFRvIII; e é sabido que os anticorpos “ch806” e “hu806” ligam-se aos resíduos 311-326 (SEQ ID NO:165) de EGFR (SEQ ID NO:146), que é amplificado ou superexpressado, ou aos resíduos 44-59 de EGFRvIII (SEQ ID NO:147).

Exemplo 3. Determinação de afinidade de ligação a EGFRvIII

[00132] As afinidades de ligação e as constantes cinéticas de anticorpos monoclonais humanos anti-EGFRvIII foram determinadas por ressonância de plasmon de superfície a 37°C. As medições foram conduzidas em um instrumento T100 BIACORE™. Os anticorpos, expressados como Fc de IgG1 humana (isto é, designações “H1H”), foram capturados sobre uma superfície sensora anti-Fc humano (formato de captura de mAb), e proteínas monoméricas solúveis [EGFR-mmh (SEQ ID NO:154) e EGFRvIII-mmh

(SEQ ID NO:152)] ou diméricas solúveis [EGFR-mFc (SEQ ID NO:155) e EGFRvIII-mFc (SEQ ID NO:153)] foram injetadas sobre a superfície. No formato de captura de receptor, quer EGFRvIII-mFc quer EGFR-mFc, foi capturada sobre o *chip* BIACORE™ e os anticorpos respectivos foram derramados sobre o *chip*. As constantes cinéticas de velocidade de associação (k_a) e velocidade de dissociação (k_d) foram determinadas pelo processamento e pelo ajuste dos dados para um modelo de ligação 1:1 usando o programa de computador de ajuste de curva Scrubber 2.0. As constantes de equilíbrio de dissociação de ligação (K_D) e as meias-vidas dissociativas ($t_{1/2}$) foram calculadas a partir das constantes cinéticas de velocidade como:

$$K_D (M) = k_d / k_a; \text{ e } t_{1/2} (\text{min}) = \ln 2 / (60 * k_d).$$

[00133] Os resultados são mostrados nas Tabelas 3 e 4. NB = sem ligação sob as condições testadas; NT= não testado.

Tabela 3 (Cinética de Ligação de Anticorpos Fc Humanos)

Ligação a 37°C / Formato de Captura de MAb					
Ab	Analito	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mmh	1,97E+04	8,95E-03	4,54E-07	1,3
	EGFR-mmh	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mFc	7,28E+04	8,07E-04	1,11E-08	14
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mmh	3,02E+04	1,02E-02	3,39E-07	1,1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,12E+05	6,42E-04	5,73E-09	18
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1,83E+04	1,64E-02	8,99E-07	0,7
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,04E+04	9,71 E-04	4,77E-08	12
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1,63E+02	1,14E-03	7,03E-06	10
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,40E+04	3,16E-04	2,26E-08	37
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1915N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H2194P	EGFRvIII-mmh	8,10E+04	1,37E-03	1,70E-08	8
	EGFR-mmh	7,60E+04	9,60E-04	1,26E-08	12
	EGFRvIII-mFc	9,54E+04	2,22E-04	2,33E-09	52
	EGFR-mFc	8,10E+04	1,99E-04	2,43E-09	58
H1H2195P	EGFRvIII-mmh	6,48E+04	6,94E-04	1,07E-08	17

Ligação a 37°C / Formato de Captura de MAb					
Ab	Analito	k_a (M⁻¹s⁻¹)	k_d (s⁻¹)	K_D (M)	T_{1/2}
	EGFR-mmh	5,66E+04	5,23E-04	9,20E-09	22
	EGFRvIII-mFc	1,02E+05	1,13E-04	1,10E-09	103
	EGFR-mFc	9,20E+04	1,89E-04	2,05E-09	61
	EGFRvIII-mmh	1,29E+05	1,53E-01	1,19E-06	0,1
Controle I	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	7,15E+04	7,36E-03	1,03E-07	1,6
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mmh	4,90E+04	7,33E-03	1,50E-07	2
Controle II	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,02E+05	4,08E-04	2,02E-09	28
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mmh	8,57E+04	5,16E-03	6,02E-08	2,2
Controle III	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,52E+05	2,98E-04	1,18E-09	39
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mmh	1,94E+05	1,59E-02	8,20E-08	1
Controle V	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,91E+05	3,71 E-04	1,95E-09	31
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mmh	NT	NT	NT	NT

Tabela 4 (Cinética de Ligação de Anticorpos Fc Humanos)

Ligação a 37°C / Formato de Captura de Receptor					
Ab	Receptor Capturado	k_a (M⁻¹s⁻¹)	k_d (s⁻¹)	K_D (M)	T_{1/2}
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mFc	9,00E+05	2,06E-04	2,30E-10	56
	EGFR-mFc	2,11E+05	1,82E-01	8,65E-07	0,1
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mFc	1,01E+06	2,15E-04	2,10E-10	54
	EGFR-mFc	1,99E+05	4,67E-01	2,34E-06	0,02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3,29E+04	6,43E-04	1,95E-08	18
	EGFR-mFc	7,77E+03	1,74E-03	2,24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9,90E+04	5,37E-04	5,40E-09	22
	EGFR-mFc	3,99E+04	9,14E-04	2,29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6,30E+04	1,00E-06	1,58E-11	11550
	EGFR-mFc	5,93E+03	1,00E-06	1,69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1,00E+05	3,28E-04	3,20E-09	35
	EGFR-mFc	4,35E+04	8,01 E-03	1,84E-07	1,4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2,17E+05	5,85E-05	2,68E-10	197
	EGFR-mFc	2,04E+05	9,15E-05	4,47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1,88E+05	7,38E-05	3,94E-10	157
	EGFR-mFc	1,87E+05	7,07E-05	3,80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2,37E+05	2,53E-05	1,06E-10	456
	EGFR-mFc	2,25E+05	5,20E-05	2,31E-10	222
Controle I	EGFRvIII-mFc	4,46E+05	4,04E-03	9,06E-09	2,9
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Controle II	EGFRvIII-mFc	1,25E+06	7,31 E-05	5,90E-11	158
	EGFR-mFc	4,44E+05	1,46E-04	3,29E-10	79
Controle III	EGFRvIII-mFc	1,49E+06	1,00E-06	6,70E-13	11550
	EGFR-mFc	2,86E+05	6,17E-05	2,15E-10	187

[00134] Conforme mostrado nas Tabelas 3 e 4, vários anticorpos mostraram seletividade para EGFRvIII e não se ligaram a EGFR de tipo selvagem no formato de captura de mAb. No formato de captura de receptor (Tabela 4) H1H863N2, H1H1915N e Controle I mostraram a seletividade

mais alta.

Experimento 4: Especificidade de anticorpo determinada por ELISA

[00135] Para adicionalmente caracterizar os mAbs anti-hEGFRvIII, a especificidade de ligação deles foi examinada por ELISA. Placas foram revestidas com um dos seguintes: EGFR-mmh (SEQ ID NO:154); EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152); e um peptídeo juncional (peptídeo-J) (SEQ ID NO:148). Para os peptídeos juncionais que estavam ligados à biotina quer na terminação-C (SEQ ID NO:149) quer na terminação-N (SEQ ID NO:150) via um ligante, a placas foram pré-revestidas com avidina. Também, um peptídeo irrelevante (peptídeo de controle) com ou sem biotina em sua terminação-N foi revestido. Anticorpos anti-EGFRvIII e também um anticorpo isótipo de controle foram adicionados às placas revestidas e permitidos incubar durante 1 hora a 25°C. As placas foram então lavadas e os mAbs anti-EGFRvIII ligados foram detectados com anticorpos anti-Fc humano conjugados com peroxidase de rábano (HRP, *Horse-Radish Peroxidase*). As placas foram descritas com uma solução de substrato tetra-metil-benzidina (TMB) para produzir uma reação colorimétrica e neutralizadas com ácido sulfúrico antes da leitura da absorbância a 450 nm em uma leitora de placas VICTOR™ X5. Análise dos dados usou um modelo sigmoidal de resposta à dose dentro do programa de computador PRISM™. O valor de EC₅₀ calculado, definido como 50% da concentração de anticorpo necessária para desenvolver resposta máxima, foi usado como um indicador de potência de ligação. Os resultados são mostrados na 5. NT: Não testado. Controles I-III: Como descritos acima.

Tabela 5

Anticorpo	EC ₅₀ (nM)						
	EGFR-mmh (25°C)	EGFRvIII-mmh (25°C)	Peptídeo-J	Peptídeo-J com Biotina C-Terminal	Peptídeo-J com Biotina N-Terminal	Peptídeo de Controle	Peptídeo de Controle com Biotina N-Terminal
H1H1863N 2 (Fuc-)	>10	0,0766	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1863N 2(Fuc+)	>10	0,113	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1911N	9,06	0,0748	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1912N	0,0405	0,0118	>10	>10	>10	>10	>10

Anticorpo	EC ₅₀ (nM)						
	EGFR-mmh (25°C)	EGFRvIII- mmh (25°C)	Peptídeo-J	Peptídeo-J com Biotina C-Terminal	Peptídeo- J com Biotina N- Terminal	Peptídeo de Controle	Peptídeo de Controle com Biotina N-Terminal
H1H1913N	2,55	2,14	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1915N	>10	0,167	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2193P	0,0040	0,0035	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2194P	0,0037	0,0032	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2195P	0,0052	0,0049	>10	>10	>10	>10	>10
Controle I	>10	0,0094	0,118	0,0153	0,0106	>10	>10
Controle II	0,0095	0,0057	>10	>10	>10	>10	>10
Controle III	0,0079	0,0048	NT	NT	NT	NT	NT
Isótipo de Controle	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

[00136] Os anticorpos H1H1863N2, H1H1915 e Controle I mostraram ligação forte à EGFRvIII, mas nenhuma ligação (>10 nM) a EGFR de tipo selvagem. Nenhum dos anticorpos, exceto o Controle I (tendo as sequências que correspondem às sequências de cadeias pesadas e leves do anticorpo “13.1.2” derivado de camundongos imunizados com peptídeo juncional (Patente U.S. nº 7.736.644), mostrou ligação aos peptídeos juncionais.

Exemplo 5: Transferência de Western de EGFR e EGFRvIII usando anticorpos anti-EGFRvIII

[00137] Um dos anticorpos, H1H1863N2, foi testado para as suas características de ligação com transferências de Western sob ambas condições reduzidas e não reduzidas. EGFR-mmh (SEQ ID NO:154) ou EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152) foi carregado para cima de géis de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio e Agente Tamponante Tris-Glicina para realização de Eletroforese (Tris-Glicina-SDS-PAGE), corrido e então transferido para nitrocelulose. Após o bloqueio, as membranas foram cortadas na metade e sondadas com quer anticorpos anti-EGFRvIII quer anticorpo anti-His. Controles I e II são como descritos acima.

[00138] Conforme mostrado na Figura 1a, H1H1862N2 (Fuc-) não se liga a EGFRvIII-mmh ou a EGFR-mmh sob condições reduzidas ou não reduzidas e dessa forma tem um epítipo conformacional para EGFRvIII. Em contraste, o Controle II liga-se a ambos EGFR variante III e de tipo selvagem sob condições reduzida e não reduzida, enquanto que o Controle I, um ligante

de peptídeo juncional, é específico para EGFRvIII. Ambos os Controles I e II, em contraste com H1H1863N2, têm epítomos de ligação lineares. A Figura 1b mostra outros anticorpos anti-EGFRvIII, que mostram comportamentos mistos em transferências de Western.

Exemplo 6: Ensaios de competição de anticorpos e de ligação ao peptídeo EGFR/EGFRvIII

[00139] H1H1863N2(Fuc-) foi testado para as suas características de ligação usando ensaios de competição de anticorpos e de ligação ao peptídeo. Para os experimentos de ligação ao peptídeo o peptídeo juncional de (SEQ ID NO:148) etiquetado via um ligante com biotina em sua terminação-C [isto é, LEEKKGNVYVTDHGGGGGSK (SEQ ID NO:149)-biotina] ou o peptídeo consistindo em resíduos 311-326 de EGFR (o “peptídeo EGFR 311-326”; SEQ ID NO:165) etiquetado via um ligante com biotina em sua terminação-C [isto é, CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK (SEQ ID NO:151)-biotina] foram capturados para formar espessura de ~ 0,4 nm usando pontas OCTET® revestidas com estreptavidina em um instrumento FORTEBIO® OCTET® RED. Após a captura de peptídeo, as pontas revestidas foram colocadas dentro de soluções 1 µM de anticorpo e as respostas de ligação foram registradas (consulte a Figura 2). Os Controles I-III são iguais àqueles descritos acima.

[00140] Conforme predito o Controle I ligou-se ao peptídeo juncional com biotina C-terminal e os Controles II e III ligaram-se ao peptídeo EGFR 311-326 com biotina C-terminal. H1H1863N2(Fuc-) falhou em ligar-se a qualquer um dos peptídeos.

[00141] Para a competição cruzada de anticorpos, ~ 200 unidades de ressonância (RU, *Resonance Units*) de hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152) foram capturadas para cima de uma superfície BIACORE™ revestida com um anticorpo policlonal de alta densidade, anti-penta-Histidina (cat. nº 34660, QUIAGEN). Usando uma metodologia de coinjeção, o hEGFRvIII-mmh

capturado foi saturado por uma injeção de duração de 5 minutos de 500 nM de um primeiro mAb imediatamente seguida por outra injeção de duração de 5 minutos de um segundo mAb (500 nM) que estava suplementado com 500 nM do primeiro mAb. Ligação significativa, expressada como RU, do segundo mAb foi interpretada como aquela que não compete com o primeiro mAb pela ligação. Para os experimentos de controle, mAbs de isotipos iguais foram usados quer como um primeiro mAb quer como um segundo mAb. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6

Superfície BIACORE™ (Primeiro anticorpo)	Ligação de Segundo Anticorpo (RU)			
	H1H1863N2(Fuc-) Resposta de Ligação	Controle I Resposta de Ligação	Controle II Resposta de Ligação	Controle III Resposta de Ligação
EGFRvIII sozinho	270	234	247	247
Complexo de EGFRvIII – H1H1863N2(Fuc-)	5	253	191	208
Complexo de EGFRvIII – Controle I	291	5	258	272
Complexo de EGFRvIII – Controle II	225	252	6	25
Complexo de EGFRvIII – Controle III	223	254	13	7

[00142] H1H1863N2(Fuc-) não competiu com qualquer um dos anticorpos de controle I-III pela ligação à superfície de captura revestida com hEGFRvIII-mmh. Conforme predito os Controles II e III, ambos os quais, conforme sabido, ligam-se aos resíduos 311-326 de EGFR, competiram um com o outro pela ligação à superfície de captura revestida com EGFRvIII-mmh.

Exemplo 7: Seletividade de ligação à célula de anticorpos anti-EGFRvIII

[00143] Para determinar a especificidade dos mAbs anti-EGFRvIII, a ligação deles às células HEK293, células HEK293 que expressam EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII), e às células A431, foi analisada por separação de células ativadas por fluorescência (FACS). As células HEK293/EGFRvIII foram preparadas por transfecção das células HEK293 com vetores de DNA resistentes à neomicina constitutivamente expressando hEGFRvIII de comprimento completo (SEQ ID NO:147) usando o reagente de transfecção

LIPOFECTAMINE™ 2000 (INVITROGEN™). A dois dias após a transfecção, as células foram deixadas em contato com o antibiótico de seleção G418 durante aproximadamente duas semanas. As populações que positivamente expressam EGFRvIII foram isoladas via separação de células ativadas por fluorescência (FACS). As células HEK293 expressando $\sim 3 \times 10^6$ cópias de EGFRvIII por célula foram usadas no experimento. Resumidamente, os anticorpos anti-EGFRvIII a 10 $\mu\text{g/mL}$ foram incubados com as células durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavados, incubados com anticorpo secundário, isto é, F(ab')₂ de cabra marcado com ficoeritrina (PE, *PhycoErythrin*) anti-IgG humana (cat. nº 109-116-170, Jackson ImmunoResearch Laboratories), seguido por uma lavagem final antes da análise FACS. Em outro conjunto de experimento, anticorpos anti-EGFRvIII foram diretamente conjugados via os resíduos de lisina deles com o corante fluorescente, ALEXA FLUOR® 488 Dye (INVITROGEN™), eliminando, com isso, a etapa de usar o anticorpo secundário. Os resultados das células HEK293 e das células HEK293/EGFRvIII utilizando anticorpos anti-EGFRvIII diretamente marcados são mostrados na Tabela 7 e aquelas usando o anticorpo secundário marcado com PE anti-Fc (humano ou de camundongo) são mostrados na Tabela 8. Os resultados das células A431 usando os anticorpos anti-EGFRvIII marcados diretamente são mostrados na Tabela 9 e aquelas usando o anticorpo secundário marcado com PE anti-Fc (humano ou de camundongo) são mostrados na Tabela 10. Os Controles I, II, III, IV e V são descritos acima. MFI: Intensidade de Fluorescência Média.

Tabela 7

Anticorpo	MFI de HEK293 Parental	MFI de HEK293/EGFRvIII	Razão (MFI de EGFRvIII / MFI Parental)
Não corado	3548	4005	1,1
H1H1863N2(Fuc-)	3776	361000	95,6
H1H1863N2 (Fuc +)	3805	360000	94,6
H1H1911N	3593	55064	15,3
H1H1912N	3727	122000	32,7
H1H1913N	4801	239000	49,8
H1H1915N	3461	73413	21,2
Controle I	3559	258000	72,5
Controle II	3582	313000	87,4

Controle IV	24954	439000	17,6
-------------	-------	--------	------

Tabela 8

Anticorpo	MFI de HEK293 Parental	MFI de HEK293/EGFRvIII	Razão (MFI de EGFRvIII / MFI Parental)
Não corado	819	920	1,1
PE anti IgG-humana	1027	1106	1,1
H1H1863N2(Fuc-)	1671	301000	180,1
H1H1911N	1812	107000	59,1
H1H2194P	981	18583	18,9
H1H2195P	1176	13517	11,5
Controle I	1480	272000	183,8
Controle II	1015	313000	308,4
Controle IV	23325	354000	15,2
Controle V	11732	997062	85,0

Tabela 9

Anticorpo	MFI de A431	Vezeas acima do Sinal de Fundo (<i>background</i>)
Não corado	6708	1,0
H1H1863N2(Fuc-)	26036	3,9
H1H1911N	15984	2,4
H1H1912N	14343	2,1
H1H1915N	8440	1,2
Controle I	9652	1,4
Controle II	15716	2,3
Controle III	71514	10,7
Controle IV	962000	143,4

Tabela 10

Anticorpo	MFI de A431	Vezeas acima do sinal de fundo (<i>background</i>)
Não corado	1314	0,9
PE anti-IgG3 humana	1428	1,0
H1H1863N2(Fuc-)	3385	2,4
H1H1911N	3140	2,2
H1H2194P	2291	1,6
H1H2195P	2227	1,6
Controle I	1448	1,0
Controle II	5576	3,9
Controle IV	395000	276,6
Controle V	4240	3,0

[00144] Vários anticorpos anti-EGFRvIII mostraram uma preferência de ligação evidente pela linhagem de célula HEK293/EGFRvIII em relação às células parentais HEK293 quando quer detectados usando anticorpos anti-EGFRvIII diretamente marcados (Tabela 7) quer um anticorpo secundário marcado com PE anti-IgG humana (Tabela 8). Os anticorpos, em sua maioria, quando incubados com as células A431 (30 minutos a 4°C) apresentaram mínima ou nenhuma ligação, exceto os anticorpos de Controles III e IV

(Tabelas 9 e 10).

Exemplo 8: Internalização de mAbs anti-EGFRvIII pelas células HEK293/EGFRvIII

[00145] mAbs anti-EGFRvIII (10 µg/mL) foram incubados com células HEK293/EGFRvIII (consulte o Exemplo 7, *supra*) durante 2 horas sobre gelo seguido por duas lavagens com PBS. As células foram então submetidas a uma incubação durante 30 min sobre gelo com anticorpo secundário de fragmentos Fab conjugado com DYLIGHT™ 488 anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories) seguida por duas lavagens adicionais com PBS. Os anticorpos foram permitidos internalizarem-se durante 1 h a 37°C em agente tamponante de internalização (PBS + FBS) ou permaneceram a 4°C. As células foram fixadas em formaldeído 4%, e os núcleos foram corados com corante “DRAQ5® DNA dye” (Cell Signaling Technology, Inc.). Imagens foram adquiridas a 40x no sistema “IMAGEEXPRESS™ high content system” (Molecular Devices) e as vesículas internalizadas foram quantificadas usando o programa de computador Columbus (Perkin Elmer). Os resultados são mostrados na Tabela 11 e na Figura 3.

Tabela 11

Ab	Intensidade de Fluorescência de Vesículas a 4°C		Intensidade de Fluorescência de Vesículas a 37°C	
	Média	± SD (desvio padrão)	Média	± SD (desvio padrão)
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
Controle I	21981	4613	263506	28067
Controle II	20339	5644	615239	144397
Controle IV	92311	19386	1078196	106073

[00146] Internalização robusta ocorreu a 37°C para H1H1863N2, Controle II, e Controle IV. Internalização foi também observada para H1H1911N, H1H1912N e Controle I.

Exemplo 9: Ligação de anticorpo anti-EGFRvIII ao xenoinxerto de tumor U87/EGFRvIII

[00147] Para adicionalmente determinar a especificidade de H1H1863N2, linhagem de célula de glioblastoma humano U87 expressando EGFRvIII foi preparada conforme descrito para as células HEK293/EGFRvIII no Exemplo 7. As células U87 expressando $\sim 1,5 \times 10^5$ cópias de EGFRvIII por célula (U87/EGFRvIII) foram usadas no experimento. As células U87/EGFRvIII (3×10^6 células) foram xenoenxertadas em vários camundongos sofrendo de imunodeficiência severa combinada (SCID, *Severe Combined ImmunoDeficiency*) e os tumores foram permitidos crescer até que fosse obtido um tamanho mediano de 200-300 mm³. Os camundongos receberam, então, injeção, via a veia da cauda, de H1H1863N2(Fuc-) ou de isótipo de controle. A 10 minutos, 4 horas e 24 horas após a injeção do anticorpo, os camundongos foram mortos e os tumores foram removidos e deixados dentro de PBS. Os tumores foram imediatamente dissociados e corados com um anticorpo anti-Fc humano conjugado com aloficocianina (APC, *AlloPhycoCyanin*) (hFc-APC). As células coradas foram lavadas 3 vezes com fluxo de PBS contendo 2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida de sódio. Os tumores nos instantes de tempo de 10 min e 4 horas foram fixados de um dia para outro e então foram medidos por citômetro de fluxo. Os tumores coletados no instante de tempo de 24 horas foram medidos sem serem fixados. Todas as amostras foram coletadas em um ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) e a intensidade de fluorescência média (MFI) foi determinada. Os resultados são mostrados na Tabela 12. Os valores de MFI são a média de 2-3 réplicas biológicas \pm o erro padrão da média (SEM, *Standard Error of the Mean*).

Tabela 12

Tempo após Injeção	MFI \pm SEM (U87/EGFRvIII)	
	Isótipo de Controle	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	708 \pm 4	2259 \pm 115
4 horas	741 \pm 34	10620 \pm 2881
24 horas	664 \pm 34	27923 \pm 3297

[00148] Comparado com o isótipo de controle, o anticorpo H1H1863N2(Fuc-) ligou-se às células de tumor U87/EGFRvIII de modo

eficiente em uma maneira dependente do tempo.

Exemplo 10: Ligação de anticorpo anti-EGFRvIII ao xenoenxerto de tumor B16F10.9/EGFRvIII

[00149] Camundongos SCID foram implantados com cinquenta mil células de melanoma murino B16F10.9 ou B16F10.9 superexpressando EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII).

[00150] As células B16F10.9/EGFRvIII foram preparadas como descrito para as células FIEK293/EGFRvIII no Exemplo 7. As células B16F10.9 expressando $\sim 1,5 \times 10^5$ cópias de EGFRvIII por célula são usadas neste experimento. Os tumores foram permitidos crescer durante aproximadamente 14 dias, até que fosse obtido um tamanho mediano de 200-300 mm³. Os camundongos receberam então injeção, via a veia da cauda, de H1H1863N2(Fuc-) ou de isótipo de controle. A 10 minutos, 4 horas e 24 horas após a injeção de anticorpo, os camundongos foram mortos e os tumores foram removidos e deixados dentro de PBS. Os tumores foram imediatamente dissociados e corados com um anticorpo anti-Fc humano conjugado com alofocianina (APC, *AlloPhycoCyanin*) (hFc-APC). As células coradas foram lavadas 3X com fluxo de PBS (PBS1x, 2% de soro fetal bovino, 0,1% de azida de sódio), fixadas e permeabilizadas usando métodos padrão. Citometria de fluxo foi usada para detectar H1H1863N2(Fuc-) ligado à superfície de célula e a análise foi realizada usando o programa de computador FlowJo (Tree Star, Inc.). Os resultados são mostrados na Tabela 13 e na Figura 4a. Para detectar ambos os anticorpos ligados à superfície de célula e intracelularmente ligados, as células foram coradas uma segunda vez usando o mesmo anticorpo anti-Fc humano (hFc-APC) após as etapas de fixação e permeabilização. Isto permitiu que fosse detectado o anticorpo intracelular. Os resultados são mostrados na Tabela 14 e na Figura 4b. Todas as amostras foram coletadas em um ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® e a intensidade de fluorescência média (MFI) foi determinada. A MFI de cada

amostra foi relatada após subtrair a MFI do controle não corado. Os valores de MFI são a média de duas réplicas biológicas (N=2) \pm o erro padrão da média (SEM). * N=1 para este instante de tempo.

Tabela 13

Tempo após Injeção	MFI \pm SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – Coloração de Superfície			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Isótipo de Controle	H1H1863N2(Fuc-)	Isótipo de Controle	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	74 \pm 67	56 \pm 2	128 \pm 49	2003 \pm 216
4 horas	80 \pm 15	195 \pm 52	54 \pm 21	4224 \pm 610
24 horas	79 \pm 21	155 \pm 42	72*	5692 \pm 595

Tabela 14

Tempo após Injeção	MFI \pm SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – Coloração de Superfície & Interna			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Isótipo de Controle	H1H1863N2(Fuc-)	Isótipo de Controle	H1H1863N2(Fuc-)
10 minutos	132 \pm 92	117 \pm 18	155 \pm 44	2627 \pm 192
4 horas	165 \pm 22	422 \pm 106	120 \pm 22	7785 \pm 782
24 horas	135 \pm 11	281 \pm 51	132*	9578 \pm 852

[00151] H1H1863N2(Fuc-) ligou-se eficientemente à superfície de células B16F10.9 expressando EGFRvIII em uma maneira dependente do tempo, enquanto que a ligação de isótipo de controle foi mínima. O aumento em ligação total (isto é, ligado à superfície de célula mais internamente ligado) de H1H1863N2(Fuc-), em comparação com sua ligação apenas à superfície de célula, indicou que os anticorpos ligados à superfície de célula foram efetivamente internalizados pelas células.

Exemplo 11: Farmacocinética de anticorpos anti-EGFRvIII em camundongos

[00152] Para determinar a seletividade *in vivo* de anticorpos anti-EGFRvIII, foi realizado um estudo farmacocinético usando camundongos de tipo selvagem (“camundongos WT, *Wild-Type*”) que naturalmente expressam EGFR de camundongo, e camundongos EGFR humanizados (“camundongos hEGFR”) expressando EGFR humano. Os camundongos foram de raças produzidas por cruzamento (camundongos híbridos) com um *background* contendo C57BL6 (75%) e 129Sv (25%). Coortes continham quer 5 camundongos WT quer 5 camundongos hEGFR. Todos os anticorpos foram

administrados subcutaneamente em uma dose de 0,2 mg/kg. Sangramentos foram coletados a 0 hora, 6 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 7 dias, 10 dias, 14 dias, 21 dias, e 30 dias após a administração. Os teores séricos de anticorpos humanos foram determinados por ELISA de sanduíche. Resumidamente, um anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico para Fc) (Jackson ImmunoResearch) foi revestido em placas de 96 poços a uma concentração de um $\mu\text{g/mL}$ e incubado de um dia para outro a 4°C . Após as placas terem sido bloqueadas com BSA, amostras de soro em diluições seriadas para seis doses e padrões de referência dos respectivos anticorpos em diluições seriadas para doze doses foram adicionadas (adicionados) às placas e incubadas (incubados) durante uma hora à temperatura ambiente. Após a lavagem para remover o anticorpo não ligado, os anticorpos humanos ligados foram detectados usando o mesmo anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico para Fc) conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch) e as placas foram descritas por substrato colorimétrico padrão tetrametilbenzidina (TMB) de acordo com a recomendação do fabricante. Absorbâncias a 450 nm foram registradas em uma leitora de placa e as concentrações de hIgG em amostras de soro foram calculadas usando a curva padrão de referência gerada na placa de amostra. Anticorpos de camundongo anti-humano (MAHA, *Mouse Anti-Human Antibodies*) foram medidos usando métodos padrão e foram, de modo geral, baixos.

[00153] As Figuras 5a-5d mostram as representações gráficas de concentração em função do tempo dos quatro anticorpos testados. É sabido que o Controle IV (“Mab C225”) liga-se a EGFR humano, mas não ao seu homólogo de camundongo. Conforme suposto, este anticorpo apresentou depuração rápida em camundongos hEGFR e depuração lenta (isto é, nenhuma depuração mediada por alvo) em camundongos WT (Fig. 5a). É sabido que o Controle I (“Mab 13.1.2”) liga-se ao peptídeo juncional

“LEEKKGNVVTDH” de EGFRvIII que não está presente em EGFR humano ou de camundongo. O anticorpo não se liga a EGFR humano ou de camundongo *in vivo*. Conforme suposto, este anticorpo apresentou taxas farmacocinéticas de depuração lentas idênticas em ambos os tipos de camundongos (Figura 5b) e não foi observada depuração mediada por alvo. O anticorpo de Controle III (“Mab hu806”) mostrou depuração intensificada em camundongos hEGFR em relação aos camundongos WT (Figura 5c). Esta descoberta está de acordo com a sua capacidade para se ligar a hEGFR *in vivo* conforme determinado por Biacore (consulte Exemplo 3, Tabela 4) e FACS (Exemplo 7, Tabela 9). A Figura 5d mostra a depuração de H1H1863N2(Fuc+). Este anticorpo, similar ao Controle I, apresentou taxas de depuração lentas idênticas em ambos os tipos de camundongos. Dessa forma, H1H1863N2 não se liga ao EGFR humano ou de camundongo *in vivo*.

Exemplo 12: Um conjugado de anticorpo-droga anti-EGFRvIII inibe o crescimento de tumor em modelos de aloenxerto de câncer de mama positivo para EGFRvIII *in vivo*

[00154] Neste Exemplo, dois diferentes conjugados de anticorpo-droga do anticorpo exemplificador H1H1863N2 anti-EGFRvIII foram testados para a capacidade deles para inibir o crescimento de tumor *in vivo*. Um primeiro ADC foi produzido conjugando H1H1863N2 com a toxina maitansinoide DM1 via um ligante MCC não clivável (consulte, por exemplo, US 5.208.020 e Pedido US 2010/0129314) para produzir “H1H1863N2-MCC-DM1”. Um segundo ADC foi produzido pela conjugação de H1H1863N2 com uma versão modificada de DM1 ligada a um ligante novo clivável, chamado de “M0026” (também conhecido como “composto 7” em WO2014/145090, cuja descrição é aqui incorporada como referência em sua totalidade), para produzir “H1H1863N2-M0026”. Quando testado para toxicidade *in vitro* contra células MMT/EGFRvIII, o H1H1863N2-MCC-DM1 apresentou uma IC₅₀ de 12 nM enquanto que o H1H1863N2-7 apresentou uma IC₅₀ de 0,8 nM

com base em equivalentes de droga.

[00155] Para comparar a eficácia *in vivo* dos anticorpos anti-EGFRvIII conjugados com DM1 e com M0026, foram realizados estudos em camundongos imunocomprometidos possuindo aloenxertos de câncer de mama positivos para EGFRvIII.

[00156] Resumidamente, aloenxertos de tumor foram estabelecidos por implantação subcutânea de $0,5 \times 10^6$ células MMT/EGFRvIII para dentro do flanco esquerdo de camundongos fêmeas CB17 SCID (Taconic, Hudson, NY). Quando os tumores haviam alcançado um volume médio de 140 mm^3 (~Dia 8), os camundongos foram separados aleatoriamente em grupos de sete, e dosados com ADCs anti-EGFRvIII usando quer o formato ligante MCC-DM1 quer o formato ligante M0026-droga. Reagentes de Controle, incluindo ADCs não ligantes usando quer o formato ligante MCC-DM1 quer o formato ligante M0026-droga, e veículo PBS foram também avaliados. ADCs foram dosados a 1 e 5 mg/kg três vezes durante uma semana e depois monitorados até que fosse alcançado um tamanho médio de tumor de aproximadamente 2.000 mm^3 no grupo administrado apenas com veículo. Neste ponto a Inibição de Crescimento de Tumor foi calculada como descrito abaixo.

[00157] O tamanho médio de tumor relativo ao grupo tratado com veículo foi calculado como segue: os tumores foram medidos com compassos de calibre duas vezes por semana até que fosse alcançado o tamanho médio de tumor no grupo tratado com veículo de 1.000 mm^3 ; o tamanho de tumor foi calculado usando a fórmula $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$. A inibição de crescimento de tumor foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})/(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}))) \times 100$, onde T (grupo tratado) e C (grupo de controle) representa a massa média de tumor no dia que o grupo tratado com veículo alcançou o tamanho médio de tumor de 1.000 mm^3 . Os resultados são resumidos na Tabela 15.

Tabela 15

Grupo de Tratamento	Tamanho de Tumor Final	Inibição de
---------------------	------------------------	-------------

	no dia 8, mm ³ (Média ± SD)	Crescimento Médio de Tumor (%)
Veículo PBS	2253 ± 217	0
Controle-MCC-DM1 1 mg/kg	2827 ± 278	-27
Controle-MCC-DM1 5mg/kg	2402 ± 256	-7
Controle-M0026 1 mg/kg	2729 ± 470	-22
Controle-M0026 5 mg/kg	2787 ± 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 1mg/kg	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 5mg/kg	471 ± 227	84
H1H1863N2-M0026 1 mg/kg	679 ± 265	74
H1H1863N2-M0026 5mg/kg	96 ± 34	102

[00158] Como resumido na Tabela 15, foi observada a inibição mais elevada de tumor em camundongos dosados com 5 mg/kg de H1H1863N2-M0026, em que foi observada regressão do tumor inicial. A inibição de crescimento de tumor de 102% resultante do tratamento com 5 mg/kg de H1H1863N2-M0026 foi significativamente maior em relação àquela observada após o tratamento de tumor com 5 mg/kg de H1H1862N2-MCC-DM1 (83%). A superioridade da inibição de crescimento de tumor pelo H1H1863N2-M0026 comparado com H1H1863N2-MCC-DM1 foi mantida também na dose de 1 mg/kg. Não foi observado efeito antitumoral nos grupos tratados com ADC de Controle usando MCC-DM1 ou M0026.

[00159] Este Exemplo, portanto, mostra que os anticorpos anti-EGFRvIII da presente invenção, quando administrados sob a forma de conjugados de anticorpo-droga, são elevadamente potentes na inibição de crescimento de tumor. O presente Exemplo adicionalmente confirma uma função para os ADCs da invenção de realmente estimularem a regressão de tumor, especialmente no contexto de anticorpos anti-EGFRvIII da invenção (por exemplo, H1H1863N2) conjugados com a nova molécula ligante/droga M0026.

[00160] A presente invenção não é limitada em escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. De fato, várias modificações da invenção além daquelas aqui descritas tornar-se-ão evidentes para aquelas pessoas versadas na técnica a partir da descrição precedente e das figuras em anexo. É pretendido que tais modificações caiam dentro do escopo das reivindicações em anexo.

Exemplo 13: Anticorpos anti-EGFRvIII-DM1 mostram especificidade para células que expressam EGFRvIII e demonstram potente atividade matadora de células

[00161] Neste Exemplo, a capacidade dos anticorpos anti-EGFRvIII humana conjugados com toxina maitansina DM1 para reduzir a viabilidade celular foi determinada usando ensaios *in vitro* baseados em célula.

[00162] EGFRvIII humana de comprimento completo (SEQ ID NO:147) ou EGFR humana de tipo selvagem (SEQ ID NO:146) foi estavelmente introduzida em linhagens de células HEK293 (293/hEGFRvIII, 293/hEGFRwt), U251 (U251/hEGFRvIII) e MMT060562 (MMT/hEGFRvIII). Todas as células foram geradas via metodologias baseadas em Lipofectamine™ 2000 e foram cultivadas em meios de crescimento completos na presença de antibiótico G418.

[00163] A expressão de EGFRwt ou de EGFRvIII na superfície de célula foi medida via análise FACS. Resumidamente, 1×10^6 células foram incubadas com 10 µg/mL de anticorpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII, um mAb de controle anti-EGFRwt (Controle IV) ou isótipo de controle durante 30 min sobre gelo em agente tamponante de diluição de anticorpo. Após duas lavagens com o agente tamponante de diluição de anticorpo, as células foram incubadas com 10 µg/mL de anticorpo secundário anti-humano conjugado com PE durante 30 min em gelo. Após duas lavagens adicionais, amostras foram corridas em um citômetro Accuri C6 (BD) ou Hypercyt (Intellicyt) e os dados foram analisados usando o programa de computador FlowJo. Os resultados são resumidos na Tabela 16. n.d. = não determinado.

Tabela 16: Expressão em Superfície de Célula em Linhagens de Células Modicadas com EGFRwt e EGFRvIII

Linhagem de Célula	Ligação via FACS (MFI Vezes Acima Isótipo de Controle)				
	Não corada	H1H1863N2 (Anti-EGFRvIII)	Controle IV (Anti-EGFRwt)	Anticorpo Secundário Sozinho	Isótipo de Controle
HEK293	1X	1X	49x	1X	1X
HEK293/hEGFRwt	1X	n.d.	332x	1X	1X
HEK293/hEGFRvIII	1X	264X	n.d.	1X	1X

U251	1X	1X	n.d.	1X	1X
U251/hEGFRvIII	1X	13X	n.d.	1X	1X
MMT/	1X	1X	n.d.	1X	1X
MMT/hEGFRvIII	1X	280X	n.d.	1X	1X

[00164] Estes resultados mostram que a expressão de EGFRvIII em superfície foi comparável nas linhagens de células HEK293/hEGFRvIII e MMT/hEGFRvIII, enquanto que os níveis de expressão de U251/EGFRvIII foram aproximadamente 20 vezes mais baixos que nos sistemas de células HEK293/hEGFRvIII e MMT/hEGFRvIII. A ligação de EGFRvIII via H1H1863N2 não foi detectável nas linhagens de células parentais. Em contraste, o anticorpo de controle anti-EGFRwt (Controle IV) ligou-se às células parentais HEK293 a 49 vezes acima do isótipo de controle. Incorporação estável de um vetor de expressão EGFRwt para dentro de células HEK293 aumentou a expressão para 332 acima do *background* e foi comparável com a expressão de EGFRvIII em células HEK293/hEGFRvIII e MMT/hEGFRvIII.

[00165] A ligação seletiva de anticorpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII a EGFRvIII foi avaliada via FACS usando linhagens de células HEK293 parental, FIEK293/hEGFRwt, HEK293/hEGFRvIII e A431. Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17: Especificidade de Ligação de Anticorpo Anti-EGFRvIII às Linhagens de Células Expressando EGFRvIII

mAb	Ligação via FACS (MFI Vezes Acima de Isótipo de Controle)			
	HEK293	HEK293/ EGFRwt	HEK293/ EGFRvIII	A431
Controle IV (Anti-EGFRwt)	83	251	855	621
H1H1863N2 (Anti- EGFRvIII)	1	3	662	13
Isótipo de Controle	1	1	1	1
Ab Secundário Sozinho	1	1	1	1
Células Não Coradas	1	1	1	1

[00166] Como mostrado na Tabela 17, ambos o anticorpo H1H1863N2 e o anticorpo de controle anti-EGFRwt (Controle IV) apresentaram ligação forte (> 650 vezes acima do *background*) às células FIEK293/EGFRvIII em relação a um isótipo de controle. Em contraste, H1H1863N2 ligou-se fracamente à linhagem de célula wt-EGFR FIEK293 (3 vezes acima do

background) e à linhagem de célula A431 endogenamente expressando EGFR (13 vezes acima do controle). O anticorpo de controle anti-EGFR-wt ligou-se fortemente às células expressando wtEGFR, confirmando a seletividade de H1H1863N2 para EGFRvIII em vez de para EGFR de tipo selvagem.

[00167] A seguir, a capacidade dos anticorpos anti-EGFRvIII humana conjugados com a toxina maitansina DM1 para reduzir a viabilidade celular foi determinada usando ensaios *in vitro* baseados em célula. As células foram semeadas em placas de 96 poços revestidas com PDL a 250-2.000 células por poço em meio de crescimento completo e permitidas crescer de um dia para outro. Para as curvas de viabilidade celular, ADCs ou droga livre (DM1-SMe) foi adicionado às células em concentrações finais na faixa de 500 nM a 5 pM e incubados durante 3 dias. As células foram incubadas com CCK8 (Dojindo) durante as 1-3 h finais e a absorbância a 450nm (OD₄₅₀) foi determinada no Flexstation3 (Molecular Devices). Os níveis de fundo de OD₄₅₀ de células tratadas com digitonina (40 nM) foram subtraídos de todos os poços e a viabilidade é expressada como uma porcentagem dos Controles não tratados. Os valores de IC₅₀ foram determinados a partir de uma equação logística de quatro parâmetros sobre uma curva de resposta de 10 pontos (GraphPad Prism). Os resultados são mostrados nas Tabelas 18A e 18B. Os valores de IC₅₀ são em nM e são normalizados para a razão de droga/anticorpo específica (DAR, *Drug/Antibody Ratio*).

Tabela 18A: Potência de Matança de Células dos Conjugados de Anticorpo-Droga Anti-EGFRvIII-DM1

Linhagem de Célula	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		HEK293/ hEGFRwt		U251	
	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança
H1H1863N2-MCC-DM1	>100	90	1	97	>100	91	48	77
Anti- EGFRwt-MCC-DM1	76	94	0,2	97	-1,0	94	ND	ND
DM1-SMe	0,31	97	0,6	99	0,57	95	1,8	81
Isótipo de Controle- MCC-DM1	>100	92	>100	96	>100	91	40	77

Tabela 18B: Potência de Matança de Células dos Conjugados de Anticorpo-Droga Anti-EGFRvIII-DM1

Linhagem de Célula	U251/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	>150	40	3	100
Anti- EGFRwt-MCC-DM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DM1-SMe	1.2	83	0.6	96	0.7	100
Isótipo de Controle- MCC-DM1	35	76	>150	66	NK	72

[00168] Conforme mostrado nas Tabelas 18A e 18B, o H1H1863N2-MCC-DM1 reduziu a viabilidade das linhagens de células HEK293/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII, e MMT/hEGFRvIII com IC₅₀s na faixa de 1,0 nM a 4,0 nM. Em contraste, um isótipo de controle conjugado com DM1 reduziu a viabilidade das células 293/EGFRvIII e MMT/hEGFRvIII com IC₅₀s maiores que 100 nM e das células U251/hEGFRvIII com um IC₅₀ de 35 nM. O H1H1863N2-MCC-DM1 não teve influência sobre as células HEK293 expressando EGFR de tipo selvagem (293/hEGFRwt) ou sobre as linhagens de células parentais de controle sugerindo especificidade para as células expressando EGFRvIII.

[00169] Dessa forma, este Exemplo demonstra que o anticorpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII tem especificidade para as linhagens de células expressando EGFRvIII e demonstra capacidade de matança específica de células quando conjugado com a toxina DM1.

Exemplo 14: Potência de matança de células aprimorada é alcançada quando um conjugado de anticorpo ligante conformacional à EGFRvIII – droga é dosado em combinação com um conjugado de anticorpo ligante ao peptídeo juncional de EGFRvIII – droga

[00170] Neste exemplo, foi determinada a capacidade para aprimorar a matança de células pela coadministração de dois tipos diferentes de conjugados de anticorpo anti-EGFRvIII-droga. Para este Exemplo as combinações testadas consistiram em dois diferentes anticorpos anti-

EGFRvIII: (1) um anticorpo específico anti-EGFRvIII que não reconhece o ADC ligante ao peptídeo juncional de EGFRvIII (chamado aqui de “ligante conformacional”); e (2) um anticorpo específico anti-EGFRvIII que reconhece o peptídeo juncional de EGFRvIII (chamado aqui de um “ligante ao peptídeo”). Conforme demonstrado no Exemplo 6, o anticorpo H1H1863N2 anti-EGFRvIII não se liga ao peptídeo juncional de EGFRvIII ou aos resíduos 311-326 de EGFR humano e é, portanto, considerado como um “ligante conformacional”.

Competição cruzada *in vitro*

[00171] Primeiro, a capacidade de H1H1863N2 para cruzadamente competir com um anticorpo que se liga ao peptídeo juncional de EGFRvIII foi determinada via um ensaio de competição de ligação. O anticorpo ligante ao peptídeo juncional anti-EGFRvIII usado neste exemplo foi o Controle V.

[00172] A competição cruzada foi determinada usando um ensaio de interferometria de biocamada (BLI, *Bio-Layer Interferometry*) isento de marcação, em tempo real, em um biossensor Octet FITX (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences). O experimento inteiro foi realizado a 25°C em agente tamponante que compreendia HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, tensoativo “Surfactant P20” 0,05% v/v, BSA 1,0 mg/mL (Agente Tamponante “Octet HBST”) com a placa agitando a uma velocidade de 1.000 rpm. Para avaliar se os dois anticorpos competiram cruzadamente pela ligação à EGFRvIII recombinante humana (hEGFRvIII.mmh; SEQ ID:152), aproximadamente ~0,35 nm de hEGFRvIII.mmh foi capturado sobre biossensores Octec revestidos com anticorpo anti-penta-His. Os biossensores com antígeno capturado foram então saturados com o primeiro anticorpo monoclonal anti-EGFRvIII (subsequentemente chamado de mAb-1) por imersão dentro dos poços contendo uma solução a 50 µg/mL de mAb-1 durante 5 minutos. Os biossensores foram então subsequentemente submersos em poços contendo uma solução a 50 µg/mL de um segundo anticorpo

monoclonal anti-EGFRvIII (subsequentemente chamado de mAb-2) durante 3 minutos. Todos os biossensores foram lavados no agente tamponante Octet HBST entre cada etapa do experimento. A resposta de ligação em tempo real foi monitorada durante o curso do experimento e a resposta de ligação no término de cada etapa foi registrada. A resposta de ligação de mAb-2 à hEGFRvIII pré-complexada com mAb-1 foi comparada e o comportamento competitivo/não competitivo de diferentes anticorpos monoclonais foi determinado.

[00173] Usando este formato de competição cruzada experimental, o H1H1863N2 não apresentou competição cruzada com o ligante ao peptídeo juncional de EGFRvIII testado, nem competiu cruzadamente pela ligação à EGFRvIII com o Controle II ou o Controle IV. Os resultados deste ensaio de competição cruzada, portanto, indicam que o H1H1863N2 tem um epítopo ligante diferente daquele do ligante ao peptídeo juncional de EGFRvIII, e também dos Controles II e IV.

Atividade de matança de células dos conjugados de anticorpo anti-EGFRvIII-droga individuais

[00174] A seguir, foi avaliada a capacidade de H1H1863N2-MCC-DM1 e de um ADC ligante ao peptídeo anti-EGFRvIII para reduzir a viabilidade celular quando administrados em combinação. A capacidade do Controle V para induzir matança celular quando conjugado com SMCC-DM1 (isto é, Controle V-MCC-DM1) foi determinada usando um ensaio *in vitro* baseado em células como descrito no Exemplo 13. Os resultados são resumidos na Tabela 19.

Tabela 19: Potência de Matança de Células dos Conjugados de Anticorpo-Droga Anti-EGFRvIII-DM1

Linhagem de Célula	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII (alta)		MMT		MMT/ hEGFRvIII (alta)	
	IC ₅₀	% Matança	IC ₅₀	% Matança	IC ₅₀	% Matança	IC ₅₀	% Matança
DM1-SMe (DM1 Livre)	0,19	98	0,25	99	0,15	100	0,18	99

Isótipo de Controle – MCC-DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2-MCC-DM1	80	97	0,37	99	200	95	3,25	97
Controle V-MCC-DM1	90	95	0,25	100	200	89	0,35	97

[00175] Conforme resumido na Tabela 19, os ADCs anti-EGFRvIII reduziram a viabilidade celular de várias linhagens de células superexpressando EGFRvIII com valores de IC₅₀ na faixa de 0,25 nM a 3,25 nM.

Atividade de matança de células de combinações por pares de conjugados de anticorpo anti-EGFRvIII-droga

[00176] A seguir, a potência de matança de células de H1H1863N2-MCC-DM1 formando par com um ADC ligante ao peptídeo anti-EGFRvIII foi testada em linhagens de células superexpressando EGFRvIII em uma razão 1:1. Os resultados são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Potência de Matança de Células de Combinações por Pares de ADCs Anti-EGFRvIII-DM1

Linhagem de Célula:		HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança	IC ₅₀ (nM)	% Matança
H1H1863N2-MCC-DM1	Nenhum	250	87	1,52	95	250	59	11,1	98
Controle V-MCC-DM1	Nenhum	100	85	0,14	98	100	67	0,7	95
H1H1863N2-MCC-DM1	Controle V-MCC-DM1	100	91	0,19	99	200	98	0,58	100
DM1-SMe (DM1 Livre)	Nenhum	0,21	96	0,28	97	0,19	100	0,19	100
Isótipo de Controle- MCC-DM1	Nenhum	200	93	95	93	150	32	100	36

[00177] Conforme resumido na Tabela 20, a combinação de H1H1863N2-MCC-DM1 (um ligante conformacional ao epítipo) e o Controle V-MCC-DM1 (um ligante ao peptídeo juncional) resultou em potência de matança de células que foi pelo menos equivalente aos, ou em determinados casos, intensificada em comparação com os tratamentos com ADC único. A falta de interferência entre os dois tipos de anticorpos sugere o

uso efetivo de dois anticorpos não competidores com citotoxinas diferentes, ou classes diferentes de citotoxinas tendo diferentes mecanismos de ação.

[00178] Em resumo, este exemplo demonstra que o H1H1863N2 não compete cruzadamente com o anticorpo de controle ligante ao peptídeo de EGFRvIII. Este epítipo peculiar permite a sua combinação com ADCs ligantes ao peptídeo de EGFRvIII para aprimorar a potência de matança de células. Esta combinação nova de ADCs anti-EGFRvIII pode permitir melhor eficácia terapêutica.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno isolado do mesmo que especificamente se liga a EGFRvIII humana, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) e uma região variável de cadeia leve (LCVR), e em que a HCVR compreende três regiões determinantes complementaridade (CDRs), HCDR1, HCDR2 e HCDR3, contidas na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:34 e a LCVR compreende três CDRs, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, contidas na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, o dito anticorpo ou fragmento do mesmo caracterizado pelo fato de que apresenta uma constante de dissociação em equilíbrio (K_D) para um dímero de EGFRvIII humana de cerca de 50 nM ou menor, de cerca de 20 nM ou menor, de cerca de 10 nM ou menor, de cerca de 5,0 nM ou menor, de cerca de 1,0 nM ou menor, ou de cerca de 0,5 nM ou menor, conforme medida por um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 2, o dito anticorpo ou fragmento do mesmo caracterizado pelo fato de que apresenta uma K_D para um dímero de EGFR humano maior que aquela para o dímero de EGFRvIII em pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 50 vezes, pelo menos cerca de 100 vezes, pelo menos cerca de 500 vezes, pelo menos cerca de 1000 vezes, pelo menos cerca de 2.000 vezes, ou pelo menos cerca de 3.000 vezes, conforme medida por um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

4. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 3, o dito anticorpo ou fragmento do mesmo caracterizado pelo fato de que não se liga a um dímero de EGFR em um nível detectável por um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo

com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as HCDR1, HCDR2 e HCDR3 compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS:36, 38 e 40, respectivamente.

6. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que as LCDR1, LCDR2 e LCDR3 compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS:44, 46 e 48, respectivamente.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, o dito anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno caracterizado pelo fato de que compreende um par de sequências de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 34/42.

8. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que se liga ao mesmo epítipo na EGFRvIII que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1.

9. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação à EGFRvIII com o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1.

10. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, o dito anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno caracterizado pelo fato de que é conjugado com uma citotoxina.

11. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a citotoxina é selecionada do grupo consistindo em biotoxinas, agentes quimioterapêuticos e radioisótopos.

12. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a citotoxina é selecionada do grupo consistindo em maitansinoides, auristatinas,

tomaimicinas, duocarmicinas, ^{225}Ac , ^{227}Th , e quaisquer seus derivados.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, um ou mais agentes terapêuticos selecionados do grupo consistindo em um agente quimioterapêutico, agentes anti-inflamatórios, e analgésicos.

15. Uso de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 13, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para o tratamento de câncer ou tumor que expressa EGFRvIII.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o câncer ou tumor é selecionado do grupo consistindo em glioblastoma, carcinoma ductal ou intraductal de mama, carcinomas de pulmão de célula não pequena, carcinomas ovarianos, câncer de próstata, e carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço.

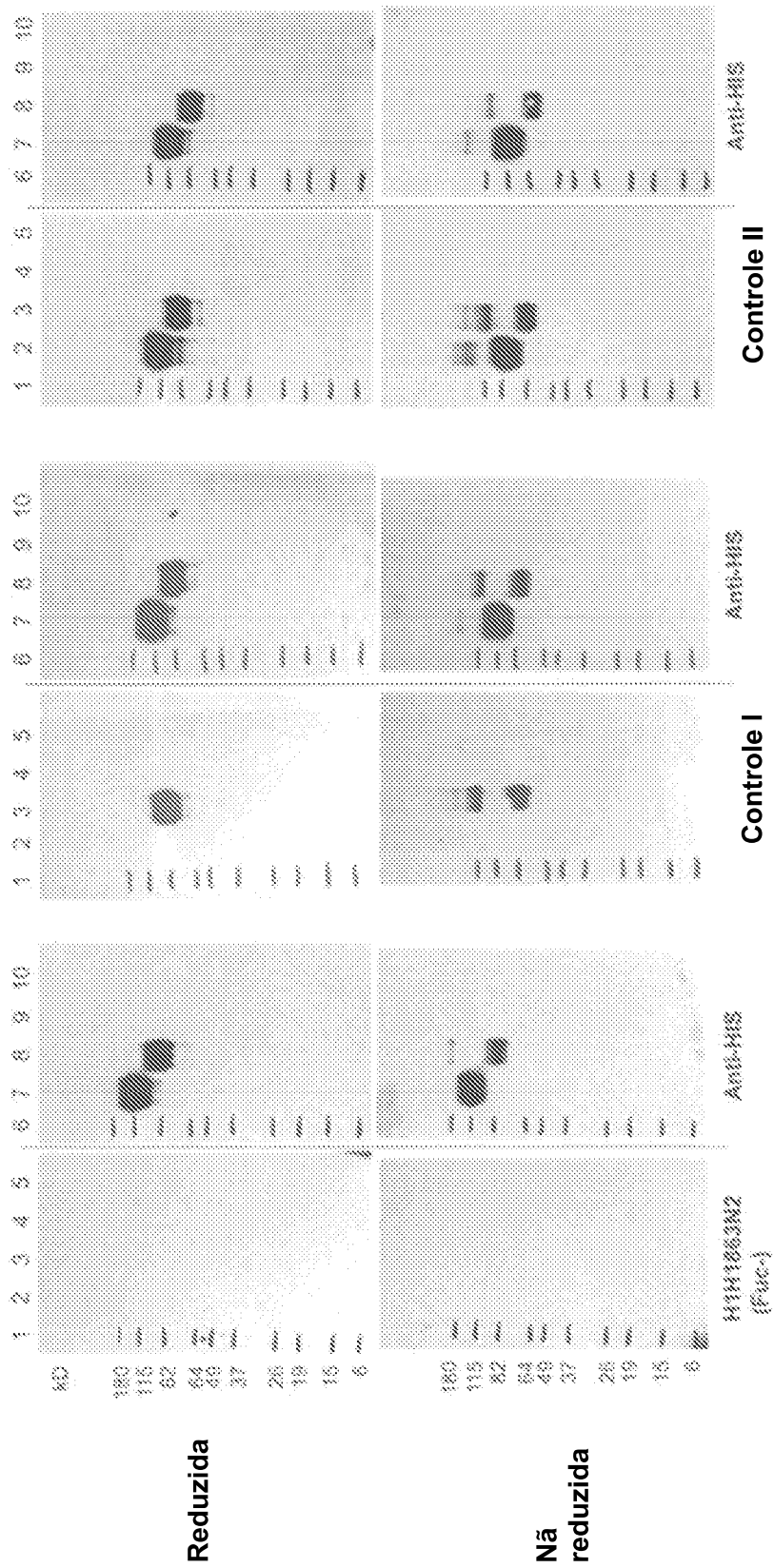
17. Uso de uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro conjugado anticorpo-droga (ADC) compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 1, e uma citotoxina, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para o tratamento de câncer, redução de crescimento de tumor e/ou causação a regressão do tumor em um paciente.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, um segundo ADC compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e uma citotoxina, em que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do segundo ADC especificamente se liga à EGFRvIII e também se liga ao peptídeo juncional de SEQ ID NO:148 e/ou ao peptídeo de SEQ ID NO:165.

19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo

fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do primeiro ADC compreende regiões determinantes de complementaridade de cadeias pesadas e leves compreendendo SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 44, 46, e 48.

20. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do primeiro ADC compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 34 e uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:42.



06

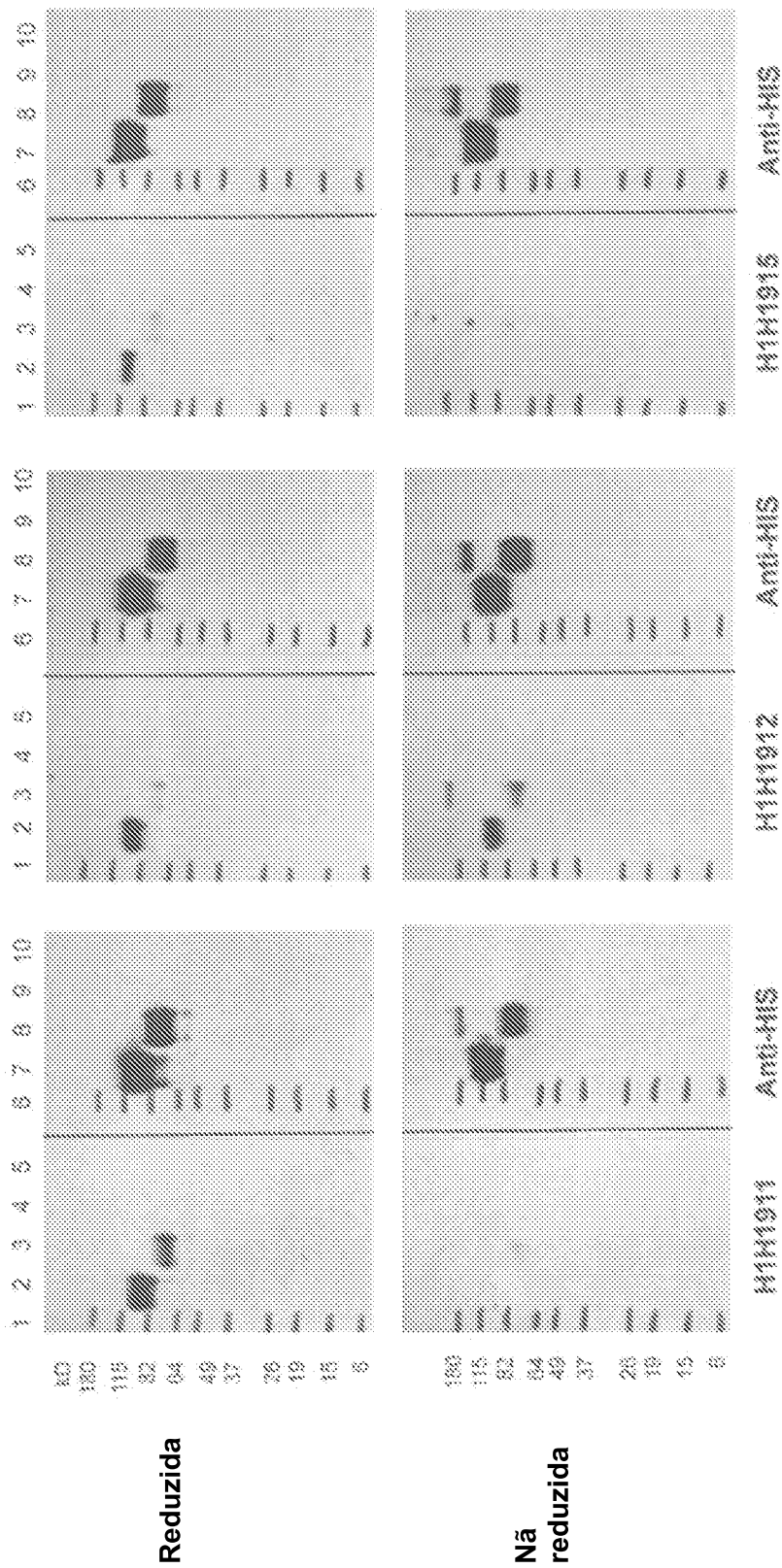


Fig. 1b

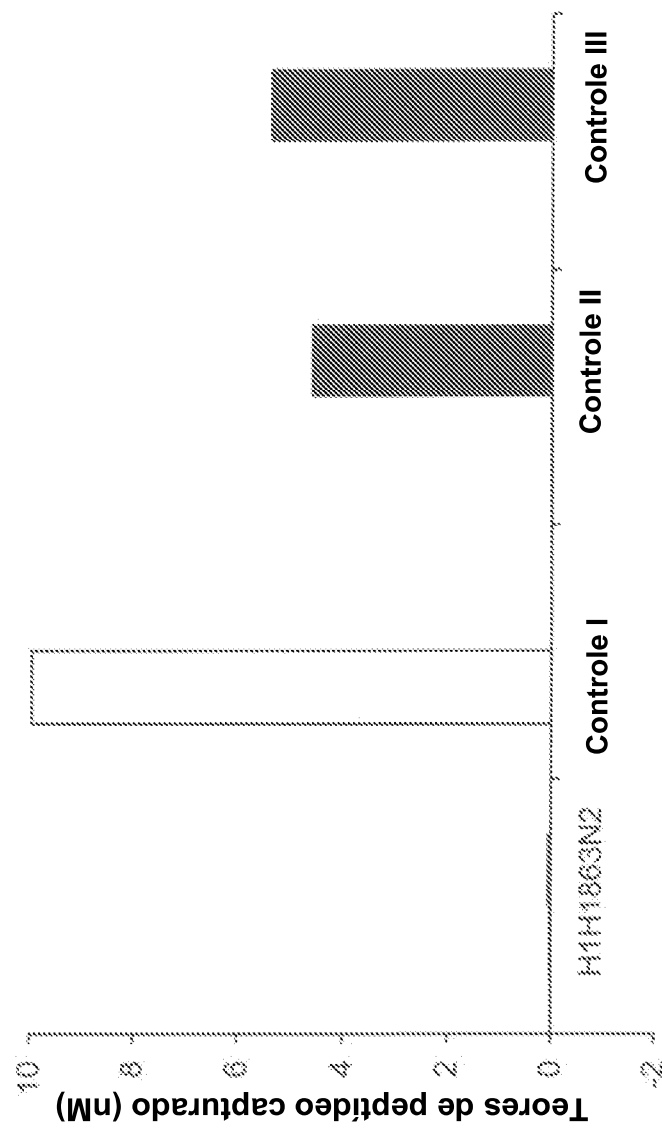


Fig. 2

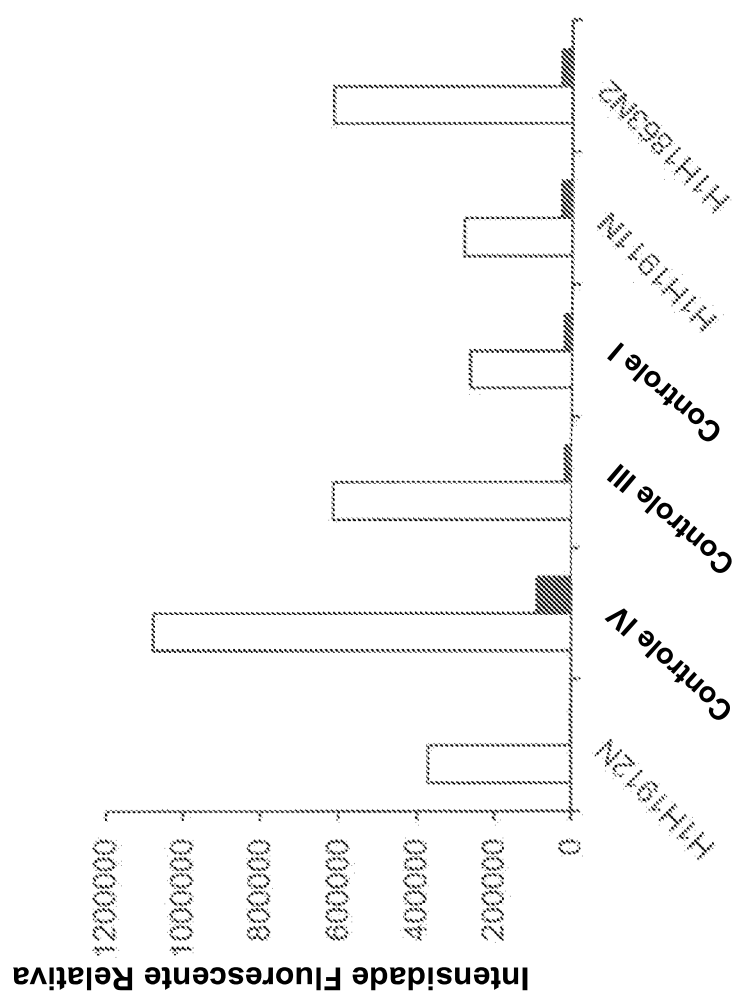


Fig. 3

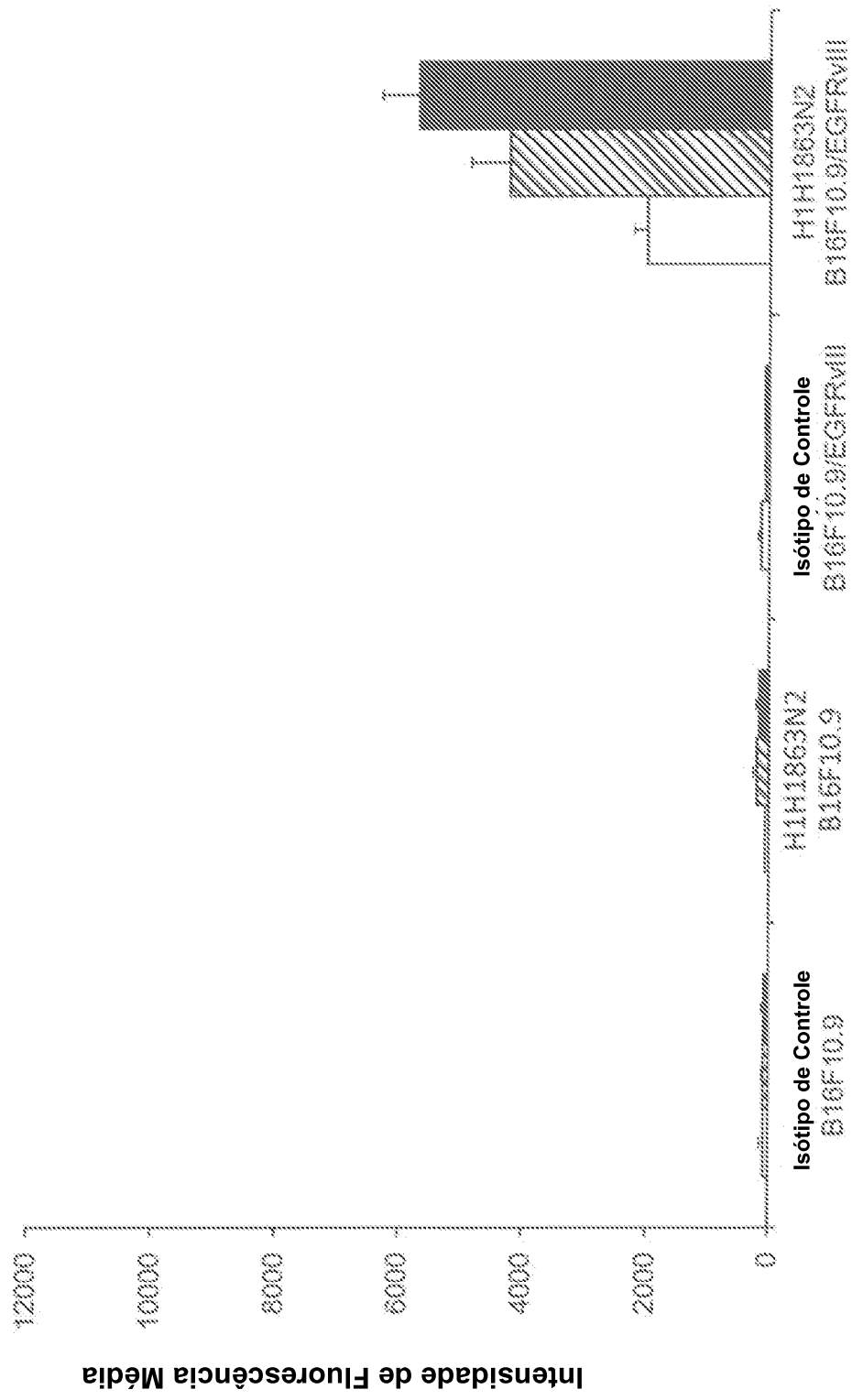


Fig. 4a

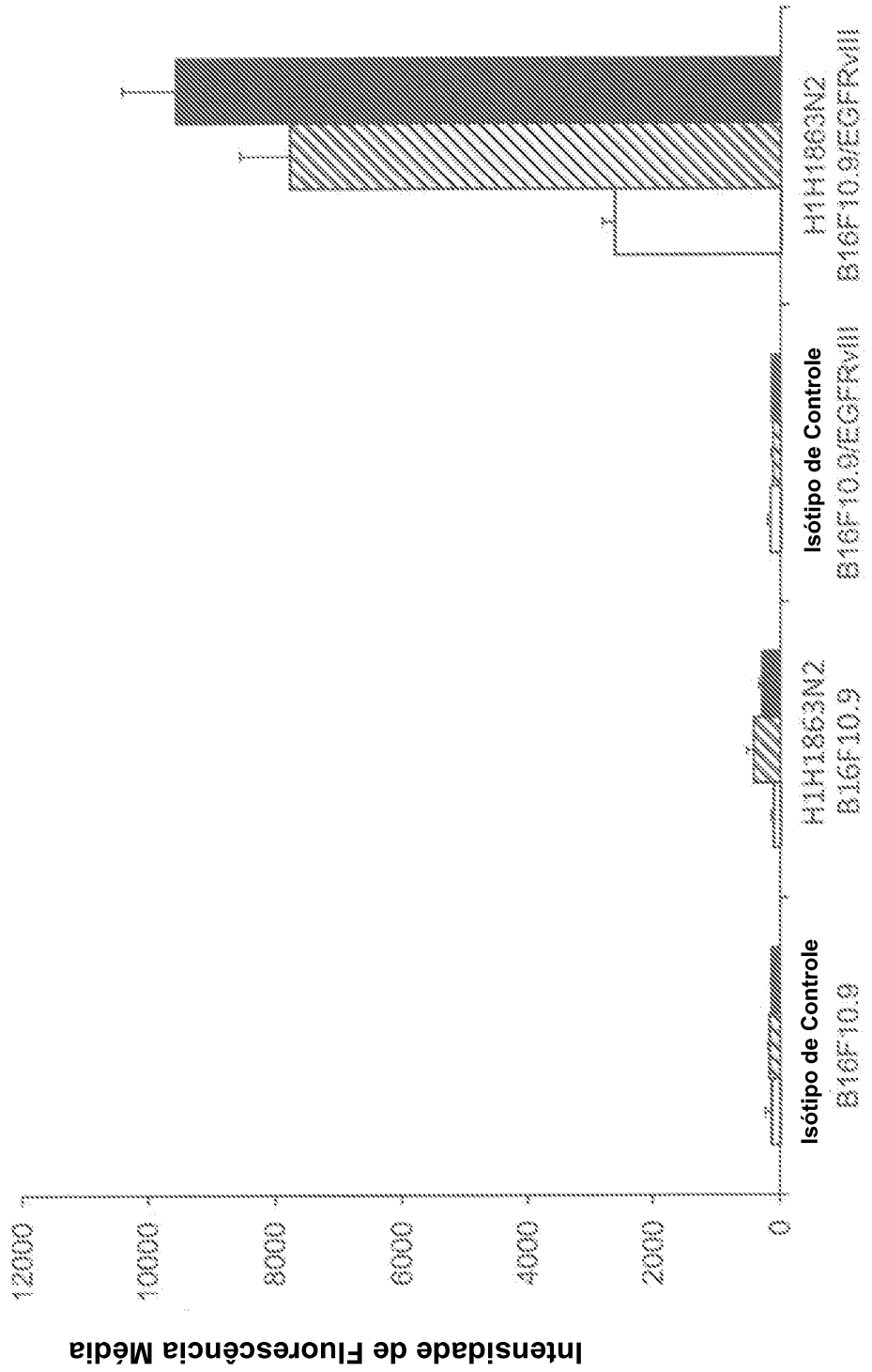


Fig. 4b

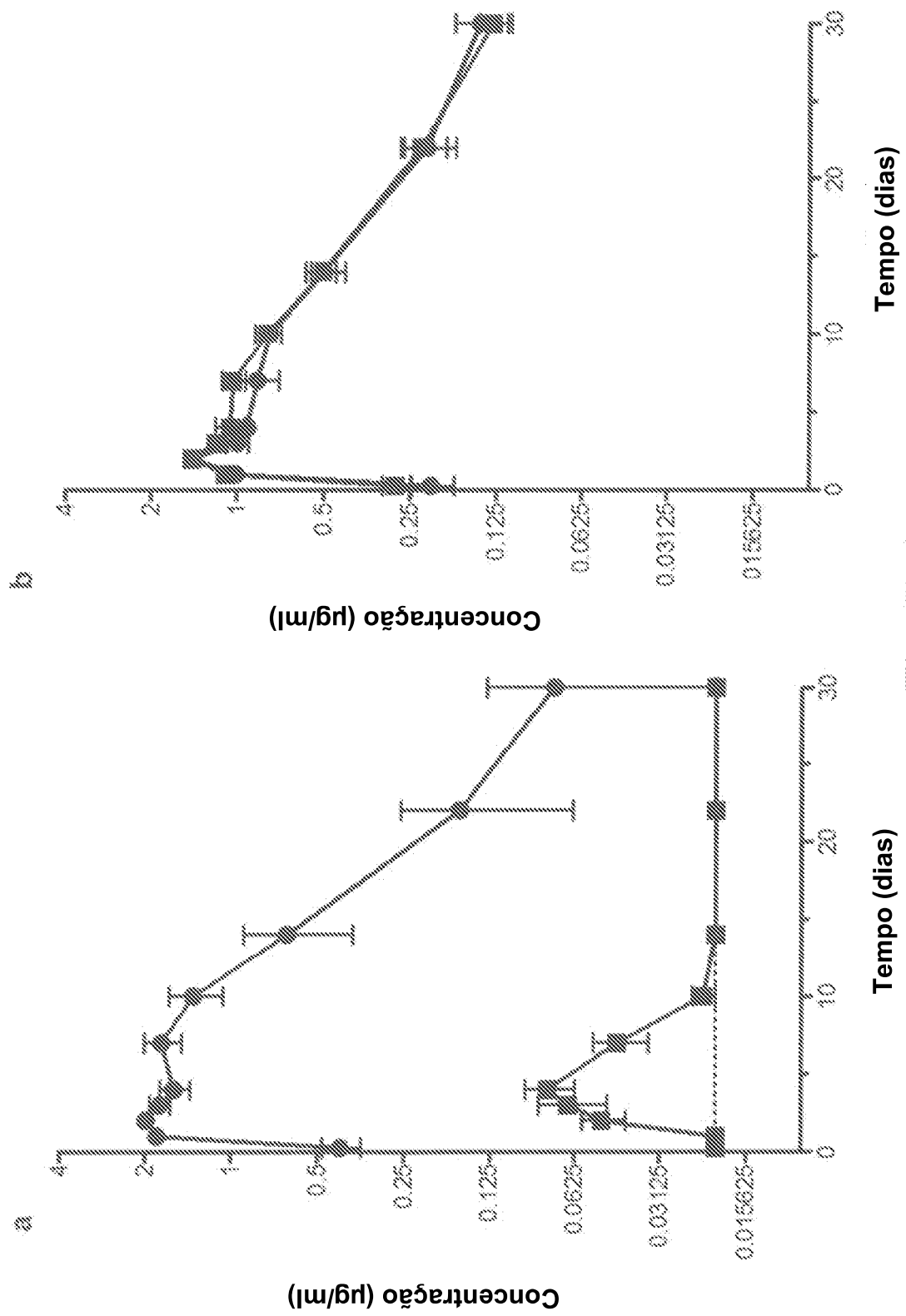


Fig. 5a-b

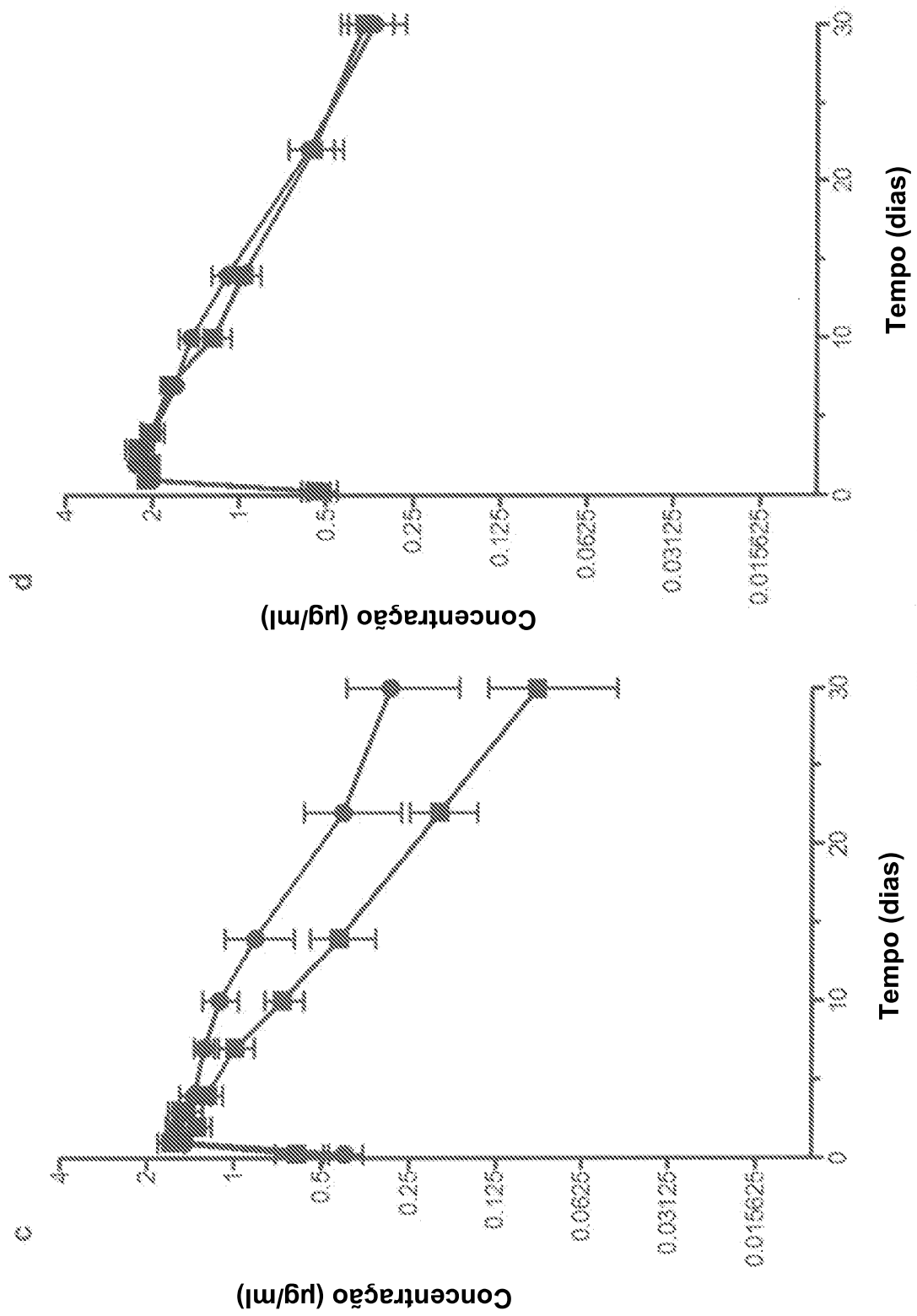


Fig. 5c-d