



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

(21) **PI0812682-8 A2**



\* B R P I O 8 1 2 6 8 2 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 03/11/2008  
(43) Data da Publicação: 22/06/2010  
(RPI 2059)

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/395  
A61K 31/337  
A61P 35/00

(54) Título: **TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO**

(30) Prioridade Unionista: 16/06/2008 US 61/061,962

(73) Titular(es): F.Hoffmann-La Roche AG, Genentech, Inc

(72) Inventor(es): Anne Blackwood Chirchir, Graham Alexander Ross, Pam Klein, Virginia Paton

(57) Resumo: A presente invenção refere-se ao tratamento de câncer de mama metastático HER2 positivo anteriormente não tratado com uma combinação de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização de HER2, e um taxeno. Em particular, a invenção considera o tratamento de câncer de mama metastático HER2 positivo em pacientes que não receberam anteriormente quimioterapia ou terapia biológica com um anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítipo 2C4, um anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítipo 4D5, e um taxeno. A invenção adicionalmente compreende estender a sobrevida de tais pacientes pela terapia de combinação da presente invenção. Em uma modalidade preferencial, o tratamento envolve a administração de trastuzumabe, pertuzumabe e docetaxel.



PI0812682-8

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao tratamento de câncer de mama metástico HER2 positivo anteriormente não tratado com uma combinação de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização contra HER2 e um taxeno. Em particular, a invenção refere-se ao tratamento de câncer de mama metástico HER2 positivo em pacientes que não receberam antes quimioterapia ou terapia biológica com um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente à epítipo 2C4, um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente à epítipo 4D5, e um taxeno. A invenção adicionalmente compreende estender a sobrevida de tais pacientes pela terapia de combinação da presente invenção. Em uma modalidade preferencial, o tratamento envolve a administração de trastuzumabe, pertuzumabe e docetaxel.

Antecedentes da Invenção

Receptores HER e Anticorpos contra esses

Os membros da família HER de receptor de tirosina quinase são importantes mediadores do crescimento, diferenciação e sobrevida celular. A família do receptor inclui quatro membros distintos incluindo receptor de fator de crescimento epidérmico ((EGFR, ErbB1, ou HER1), HER2 (ErbB2 ou p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tyro2)).

O EGFR, codificado pelo gene erbB1, foi implicado de forma causal na malignidade humana. Em particular, a expressão aumentada de EGFR foi observada em câncer de mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago bem como em glioblastomas. A expressão de receptor EGFR aumentada é frequentemente associada com a produção aumentada do ligante do EGFR, fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), pelas mesmas células tumorais resultando em ativação do receptor por uma rota estimulatória autócrina. Baselga e Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Os anticorpos monoclonais contra o EGFR ou seus ligantes, TGF- $\alpha$  e EGF, foram avaliados como agentes terapêuticos no tratamento de tais

malignidades. Vide, por exemplo, Baselga e Mendelsohn, *acima*; Masui e outros, *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); e Wu e outros, *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

O segundo membro da família HER, p185<sup>neu</sup>, foi originalmente  
 5 identificado como o produto do gene transformante a partir de neuroblastomas de ratos quimicamente tratados. A forma ativada do proto-oncogene *neu* resulta de uma mutação pontual (valina para ácido glutâmico) na região transmembrana da proteína codificada. A amplificação do homólogo humano de *neu* é observada em cânceres de mama e de ovário e correlaciona com  
 10 um prognóstico pobre (Slamon e outros, *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon e outros, *Science*, 244:707-712 (1989); e Patente US Nº 4.968.603). Até agora, nenhuma mutação pontual análoga a essa no proto-oncogene *neu* foi relatada para tumores humanos. A superexpressão de HER2 (frequentemente, mas não uniformemente devido à amplificação de gene) foi  
 15 também observada em outros carcinomas incluindo carcinomas do estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireóide, pâncreas, e bexiga. Vide, entre outros, King e outros, *Science*, 229:974 (1985); Yokota e outros, *Lancet*. 1:765-767 (1986); Fukushige e outros, *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin e outros, *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen e outros, *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura e outros, *Cancer Res.*, 51:1034  
 20 (1991); Borst e outros, *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner e outros, *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern e outros, *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park e outros, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau e outros, *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland e outros *Br. J. Cancer* 57:358-363  
 25 (1988); Williams e outros, *Pathobiology* 59:46-52 (1991); and McCann e outros, *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 pode ser superexpresso em câncer de próstata (Gu e outros, *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross e outros, *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross e outros, *Cancer* 79:2162-70 (1997); e Sadasivan e outros, *J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

30 Os anticorpos direcionados contra os produtos de proteína p185<sup>neu</sup> de rato e HER2 humana foram descritos.

Drebin e amigos elevaram os anticorpos contra o produto de ge-

ne *neu* de rato, p185<sup>neu</sup>. Vide, por exemplo, Drebin e outros, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers e outros, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); e WO94/22478. Drebin e outros *Oncogene* 2:273-277 (1988) relataram que misturas de anticorpos que reagem com duas regiões distintas de p185<sup>neu</sup> resultam em efeitos cinérgicos antitumor em células NIH-3T3 transformadas por *neu* implantadas em ratos pelados. Vide também Patente U.S. 5.824.311 emitida em 20 de Outubro de 1998.

Hudziak e outros, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) descrevem a geração de um painel de anticorpos contra HER2 que foram caracterizados usando a linhagem celular de tumor de mama humano SK-BR-3. A proliferação das células SK-BR-3 seguindo a exposição aos anticorpos foi determinada por coloração violeta cristal das monocamadas depois de 72 horas. Usando esse ensaio, a inibição máxima foi obtida com o anticorpo chamado 4D5 que inibiu a proliferação celular em 56%. Outros anticorpos no painel reduziram a proliferação celular em uma extensão menor nesse ensaio. O anticorpo 4D5 foi adicionalmente encontrado para sensibilizar as linhagens celulares de tumor na mama com superexpressão de HER2 aos efeitos citotóxicos de TNF- $\alpha$ . Vide também Patente U.S. Nº 5.677.171 emitida em 14 de Outubro de 1997. Os anticorpos contra HER2 discutidos em Hudziak e outros são adicionalmente caracterizados em Fendly e outros *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts e outros *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup e outros *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard e outros *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar e outros *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis e outros *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras e outros *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta e outros *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski e outros *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott e outros *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza e outros *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis e outros *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); e Schaefer e outros *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Uma versão humanizada recombinante do anticorpo contra HER2 4D5 de ratos (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumabe ou HER-

CEPTIN®; Patente U.S. Nº 5.821.337) é clinicamente ativa em pacientes com câncer de mama metástico com superexpressão de HER2 que receberam terapia anticâncer anterior extensiva (Baselga e outros, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). O trastuzumabe recebeu aprovação de comercialização a partir da Food and Drug Administration em 25 de Setembro de 1998, para o tratamento de pacientes com câncer de mama metástico cujos tumores superexpressam a proteína HER2. Enquanto a administração de trastuzumabe levou a excelentes resultados no tratamento de câncer de mama, dados recentes a partir de exames clínicos de lapirinib parecem sugerir que mesmo com a administração de trastuzumabe, HER2 executa uma função ativa na biologia do tumor (Geyer e outros, *N Engl J Med* 2006; 355:2733-2743).

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

Exames da homologia resultaram na identificação de dois outros membros da família do receptor de HER; HER3 (Patente U.S. Nºs 5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus e outros *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) e HER4 (Pedido de Patente EP Nº 599.274; Plowman e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); e Plowman e outros, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos esses receptores exibem expressão aumentada em ao menos algumas linhagens celulares de câncer de mama.

Os receptores de HER são geralmente encontrados em várias combinações em células e crê-se que a heterodimerização aumenta a diversidade de respostas celulares em uma variedade de ligantes de HER (Earp e

outros, *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR é ligado por seis ligantes diferentes, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina, fator de crescimento epidérmico de ligação da heparina (HB-EGF), betacelulina e epiregulina (Groenen e outros, *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Uma família de proteínas heregulina resultante da união alternativa de um único gene são ligantes para HER3 e HER4. A família de heregulina inclui heregulinas alfa, beta e gama (Holmes e outros, *Science*, 256:1205-1210 (1992); Patente U.S. Nº 5.641.869; e Schaefer e outros *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); fatores de diferenciação *neu* (NDFs), fatores de crescimento da glia (GGFs); atividade de indução de receptor de acetilcolina (ARIA); e fator derivado de neurônio sensorial e motor (SMDF). Para uma revisão, vide Groenen e outros, *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) e Lee e outros *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recentemente, três ligantes de HER adicionais foram identificados; neuregulina-2 (NRG-2) que é relatado como ligando ou HER3 ou HER4 (Chang e outros *Nature* 387 509-512 (1997); e Carraway e outros, *Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 que liga HER4 (Zhang e outros, *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); e neuregulina-4 que se liga a HER4 (Harari e outros, *Oncogene* 18:2681-89 (1999)), HB-EGF, betacelulina e epiregulina também se ligam a HER4.

Enquanto EGF e TGF- $\alpha$  não se ligam a HER2, EGF estimula EGFR e HER2 a formarem um heterodímero, que ativa EGFR e resulta em transfosforilação de HER2 no heterodímero. A dimerização e/ou a transfosforilação parece ativar a tirosina quinase de HER2. Vide Earp e outros, acima. Igualmente, quando HER3 é co-expresso com HER2, um complexo de sinalização ativo é formado e anticorpos direcionados contra HER2 são capazes de romper esse complexo (Sliwkowski e outros, *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, a afinidade de HER3 para heregulina (HRG) é aumentada a um estado de afinidade mais alto quando co-expressa com HER2. Vide também, Levi e outros, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); e Lewis e outros, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) com relação ao

complexo de proteínas HER2-HER3. HER4, como HER3, forma um complexo de sinalização ativo com HER2 (Carraway e Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

As publicações de patente referidas a anticorpos contra HER incluem: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US2002/0192211A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US 2004/0236078A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, WO 98/17797, US 6.127.526, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, WO 99/31140, US 2003/0147884A1, US 2003/0170234A1, US 2004/0037823A1, US 2005/0002928A1, US 6.573.043, US 6.905.830, US 2003/0152987A1, WO 99/48527, US 2002/0141993A1, US2005/0244417A1, Patente US N<sup>o</sup> 6.949.245, US 2003/0086924, US 2004/0013667A1, WO 00/69460, US 2003/0170235A1, US 7.041.292, WO 01/00238, US 2006/0083739, WO 01/15730, US 6.627.196B1, US 6.632.979B1, WO01/00244, US 2002/0001587A1, US 2002/0090662A1, US 6.984.494B2, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 2005/099756, US2006/0013819, WO2006/07398A1, US2006/0018899, WO 2006/33700, US2006/0088523, US 2006/0034840, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, WO 2005/16968, US2005/0038231A1US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412.116 B1, EP 494.135 B1, US 5.824.311, EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US 5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272, US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO

97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, US 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 5 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/ 10 0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/ 0022918, US 2002/0051785 A1, US 6.767.541, WO 01/76586, US 2003/ 0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, 15 WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842, e WO 03/86467.

Os pacientes tratados com anticorpo contra HER2 trastuzumabe são selecionados para terapia baseada na superexpressão/amplificação de HER2. Vide, por exemplo, WO 99/31140 (Paton *e outros*), US 2003/0170234A1 20 (Hellmann, S.), e US 2003/0147884 (Paton *e outros*); bem como WO 01/89566, US 2002/0064785, e US 2003/0134344 (Mass *e outros*). Vide, também, Patente U.S. Nº 6.573.043, Patente U.S. Nº 6.905.830, e US 2003/0152987, Cohen *e outros*, considerando imuno-histoquímica (IHC) e hibridização in situ por fluorescência (FISH) para detectar superexpressão e amplificação de HER2.

25 WO 2004/053497 e US 2004/024815A1 (Bacus *e outros*), bem como US 2003/0190689 (Crosby e Smith), referem-se a determinar ou prever resposta à terapia com trastuzumabe. US 2004/013297A1 (Bacus e outros) considera determinar ou prever resposta a terapia com anticorpos EGFR ABX0303. WO 2004/000094 (Bacus *e outros*) é direcionada a determinar 30 resposta a GW572016, uma pequena molécula, inibidor de tirosina quinase EGFR-HER2. WO 2004/063709, Amler *e outros*, refere-se a biomarcadores e métodos para determinar sensibilidade ao inibidor de EGFR, cloridrato de

erlotinibe. US 2004/0209290 e WO 04/065583, Cobleigh e outros, consideram os marcadores de expressão de gene para prognóstico de câncer de mama. Vide, também, WO 03/078662 (Baker e outros), e WO03/040404 (Bevilacqua e outros). WO 02/44413 (Danenberg, K.) refere-se a determinar expressão de gene EGFR e HER2 para determinar um regime de quimioterapia.

Os pacientes tratados com pertuzumabe podem ser selecionados para terapia baseada em ativação ou dimerização de HER. As publicações de patente considerando pertuzumabe e a seleção de pacientes para terapia com ele incluem: Patente US Nº 6.949.245, WO 01/00245, US 2005/0208043, US 2005/0238640, US 2006/0034842, e US 2006/0073143 (Adams e outros); US 2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US 2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); bem como WO 2004/008099A2, e US 2004/0106161 (Bossenmaier e outros).

Cronin e outros, *Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004) descreve a medição de expressão de gene em tecidos embutidos em parafina arquivados. Ma e outros, *Cancer Cell* 5:607-616 (2004) descreve perfil de gene por microarranjo de oligonucleotídeo de gene usando RNA isolado de seções de tecido de tumor obtido de biópsias primárias arquivadas.

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

O bloqueio de pertuzumabe da formação de heterodímeros HER2-HER3 em células tumorais foi demonstrado como inibindo a sinalização celular crítica, que resulta em proliferação e sobrevivência com tumor reduzidas (Agus e outros, *Cancer Cell* 2:127-37 (2002)).

O pertuzumabe passou por testes como um único agente na clínica com um exame de fase Ia em pacientes com cânceres avançados e exames de fase II em pacientes com câncer no ovário e câncer de mama bem como câncer de pulmão e próstata. Em um estudo de fase I, os pacientes com tumores sólidos metastáticos ou recorrentes, localmente avançados, incuráveis que progrediram durante ou depois de terapia padrão foram tratados com pertuzumabe obtido intravenosamente a cada 3 semanas. O pertuzumabe foi geralmente bem tolerado. A regressão do tumor foi alcançada em 3 de 20 pacientes avaliados por resposta. Dois pacientes confirmaram respostas parciais. Doença estável durando por mais de 2,5 meses foi observada em 6 dos 21 pacientes (Agus e outros, *Pro Am Soc Clin Oncol* 22:192 (2003)). Em doses de 2,0 a 15 mg/kg, a farmacocinética de pertuzumabe foi linear, e a meia-vida está na faixa de 2,69 a 3,74 mL/dia/kg e a meia-vida de eliminação terminal estava na faixa de 15,3 a 27,6 dias. Os anticorpos para pertuzumabe não foram detectados (Allison e outros, *Pro Am Soc Clin Oncol* 22:197 (2003)).

US 2006/0034842 descreve métodos para tratar câncer de expressão de ErbB com combinações de anticorpo anti ErbB2. WO 08/031531 descreve o uso de trastuzumabe e pertuzumabe no tratamento de câncer metastático de HER2 positivo, tal como câncer de mama. Baselga e outros, *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Col. 25, Nº 18S (Suplemento de 20 de Junho), 2007:1004 relatam o tratamento de pacientes com câncer de mama de HER2 positivo pré-tratados, que progrediram durante o tratamento com trastuzumabe, com uma combinação de trastuzumabe e pertuzumabe. Portera e outros, *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 25, Nº 18S (Suplemento de 20 de Junho), 2007:1028 avaliou a eficácia e segurança da terapia de combinação de trastuzumabe + pertuzumabe em pacientes com câncer de mama de HER2 positivo, que teve doença progressiva em terapia à base de trastuzumabe. Aos autores concluíram que avaliação adicional da eficácia de tratamento de combinação foi exigido definir o risco geral e benefício desse regime de tratamento.

O pertuzumabe foi avaliado em estudos de Fase II em combina-

ção com trastuzumabe em pacientes com câncer de mama metastático de HER2 positivo que receberam previamente trastuzumabe para doença metastática. Um estudo, conduzido pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), arrolou 11 pacientes com câncer de mama metastático de HER2 positivo previamente tratados. Dois dos 11 pacientes exibiram uma resposta parcial (RP) (Baselga e outros, *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings; 25:18S (Suplemento de 20 de Junho): 1004.

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres, com uma prevalência global de mais de 1 milhão de pacientes e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 400.000 mortes por ano (International Agency for Research on Cancer; <http://www-dep.iarc.fr>; Globocan 2002). Enquanto a detecção anteriormente aprovada e avanços na terapia sistêmica para doença em estágio precoce resultaram em um declínio em mortalidade de câncer de mama desde 1989, câncer de mama metastático (MBC) permanece amplamente incurável com uma sobrevida média de aproximadamente 24 meses. Os fatores associados com a sobrevida pobre incluem idade  $\geq$  50 anos, doença visceral, intervalo de doença livre mais curto (DFI), tumores aneuplóide, tumores com uma alta fração de fase S, acúmulo p53, baixa expressão bcl-2, estado de receptor de hormônio negativo, e estado de receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2) (Chang J, e outros, *Cancer* 2003; 97:545–53).

Embora os agentes quimioterápicos, tal como antraciclina, taxanos, agentes alquilantes, e/ou vinca alcalóides, usados como únicos agentes, produziram importantes resultados em estender a sobrevida de pacientes com câncer de mama metastático, as raras respostas completas são de vida curta, e usualmente a doença continua a progredir. (Chung C, Carlson R. *The Oncologist* 2003; 8:514–20; Bernard-Marty C, e outros, *The Oncologist* 2003; 9:617–32).

O anticorpo contra HER2 trastuzumabe é aprovado para uso como monoterapia ou em combinação com quimioterapia no ajuste metastático, e em combinação com quimioterapia como tratamento adjuvante para câncer de mama de HER positivo. O gerenciamento otimizado de câncer de

mama metástico agora leva em conta não somente uma condição geral do paciente, histórico médico, volume do tumor, e estado do receptor, mas também o estado de HER2.

Um estudo de Fase II randomizado avaliou trastuzumabe e docetaxel versus somente docetaxel como um tratamento de primeira linha para câncer de mama metástico de HER2 positivo (Marty e outros, *J Clin Oncol* 2005; 23:4265-4274).

O aprimoramento na sobrevida é um objetivo importante no tratamento de pacientes diagnosticados com câncer de mama metástico de HER2 positivo. Apesar dos avanços em terapia de câncer, há significativa necessidade médica para novos regimes de tratamento de modo a alcançar esse objetivo.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção fornece dados clínicos de pacientes humanos com câncer de mama tratados com uma combinação de trastuzumabe, pertuzumabe e docetaxel.

Em um aspecto, a invenção considera um método para o tratamento de câncer de mama, compreendendo administrar a um paciente com câncer de mama metástico de HER2 positivo uma quantidade eficaz de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização de HER2, e um taxeno, sendo que o paciente não recebeu quimioterapia antes ou terapia biológica.

Em uma modalidade, o anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento se liga a um epítipo dentro do Domínio IV (ID SEQ NO:17) da sequência de aminoácido HER2.

Em outra modalidade, o anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento se liga essencialmente ao epítipo 4D5 de HER2.

Em ainda outra modalidade, o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 se liga a HER2 na junção dos domínios I, II e III (ID de SEQ N<sup>os</sup> 14, 15 e 16).

Em uma modalidade adicional, o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 se liga essencialmente ao epítipo 2C4.

Em ainda uma modalidade adicional, o anticorpo inibidor de crescimento e/ou o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 é um fragmento de anticorpo.

5 Em uma modalidade adicional, o anticorpo inibidor de crescimento e/ou o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 é quimérico, humanizado ou humano.

Em uma modalidade particular, o anticorpo inibidor de crescimento é trastuzumabe, ou um fragmento desse, o anticorpo de dimerização de HER2 é pertuzumabe, ou um fragmento desse, e o taxeno é docetaxel.

10 Em outro aspecto, a invenção considera um método para o tratamento de câncer de mama, compreendendo administrar a um paciente com câncer de mama metastático com HER2 positivo uma quantidade eficaz de um primeiro anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítipo 2C4, um segundo anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítipo  
15 4D5, e um taxeno, sendo que o paciente não recebeu quimioterapia antes ou terapia biológica.

Em uma modalidade, o paciente é um paciente humano.

Em outra modalidade, o primeiro e o segundo anticorpos são anticorpos monoclonais.

20 Em ainda outra modalidade, ao menos um do primeiro e do segundo anticorpos é um fragmento de anticorpo.

Em uma modalidade diferente, ao menos um do primeiro e do segundo anticorpo é quimérico, humanizado ou humano.

Em uma modalidade particular, o primeiro anticorpo é pertuzumabe.

25 Em outra modalidade particular, o segundo anticorpo é trastuzumabe.

Em ainda outra modalidade particular, o taxeno é docetaxel.

Em uma modalidade adicional, o primeiro e o segundo anticorpos e o dito taxeno são administrados ao mesmo tempo.

30 Em uma modalidade ainda adicional, o primeiro e o segundo anticorpos e o taxeno são administrados consecutivamente, em qualquer ordem.

Em outra modalidade, a administração do primeiro anticorpo

precede a administração do segundo anticorpo e o taxeno.

Em ainda outra modalidade, ao menos um do pertuzumabe e do trastuzumabe é um anticorpo nu.

Em uma modalidade diferente, ao menos um do pertuzumabe e do trastuzumabe é um anticorpo intacto.

Em uma modalidade adicional, a administração do pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel resulta em um efeito cinérgico.

Em uma modalidade ainda adicional, a administração do pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel estende a sobrevida do paciente humano em relação ao tratamento na ausência de ao menos um de pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel. Em uma modalidade particular, a sobrevida livre de progressão (PFS) ou sobrevida global (OS) é estendida.

Embora os métodos da presente invenção possam ser executados na ausência de quaisquer outros meios de terapia contra câncer, por exemplo, na ausência de um agente terapêutico adicional, incluindo agentes quimioterápicos e biológicos, os métodos podem opcionalmente compreender a administração de um agente terapêutico adicional selecionado a partir do grupo que consiste em agente quimioterápico, um anticorpo HER diferente, anticorpo direcionado contra um antígeno associado a tumor, composto anti-hormonal, cardioprotetor, citoquina, inibidor de COX, fármaco anti-inflamatório não esteroide, inibidor de farnesil transferase, anticorpo que se liga à proteína oncofetal CA 125, vacina contra HER2, terapia específica para HER, inibidor de Raf ou ras, doxorubicina lipossômica, topotecana, taxeno, inibidor de tirosina quinase duplo, TLK286, EMD-7200, um medicamento que trata náusea, um medicamento que impede ou trata erupções na pele ou terapia de acne padrão, um medicamento que trata ou impede diarreia, um medicamento que reduz a temperatura do corpo, e um fator de crescimento hematopoiético.

Em outro aspecto, a invenção considera um kit compreendendo um primeiro anticorpo contra HER2 ligando-se essencialmente ao epítopo 2C4, um segundo anticorpo contra HER2 ligando-se essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno, e um elemento de bula ou rótulo com direções para

tratar um paciente com câncer de mama metástico com HER2 positivo, que não recebeu antes de quimioterapia ou terapia biológica.

Em ainda outro aspecto, a invenção considera um método de promover pertuzumabe para o tratamento de um paciente com câncer de mama metástico com HER2 positivo que não recebeu antes quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com trastuzumabe e um taxeno. Exatamente como antes, o taxeno, pode ser, por exemplo, docetaxel.

Em um aspecto adicional, a invenção considera um método de promover trastuzumabe para o tratamento de um paciente com câncer de mama metástico com HER2 positivo que não recebeu antes quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com pertuzumabe e um taxeno, tal como docetaxel.

Em um aspecto ainda adicional, a invenção considera um método para promover um taxeno para o tratamento de um paciente com câncer de mama metástico com HER2 positivo que não recebeu antes quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com pertuzumabe e trastuzumabe, sendo que o taxeno pode, por exemplo, ser docetaxel. Sem limitação, a promoção pode estar na forma de um material escrito, ou um elemento de bula.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 fornece um esquema da estrutura de proteína HER2, e sequências de aminoácido para Domínios I-IV (ID SEQ N<sup>os</sup> 14-17, respectivamente) do domínio extracelular dessas.

As Figuras 2A e 2B descrevem alinhamentos das sequências de aminoácidos dos domínios da variável leve (V<sub>L</sub>) (Fig. 2A) e da variável pesada (V<sub>H</sub>) (Fig. 2B) de anticorpo monoclonal de ratos 2C4 (ID SEQ N<sup>os</sup> 1 e 2, respectivamente); os domínios V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> de variante 574/pertuzumabe (ID SEQ N<sup>os</sup> 3 e 4, respectivamente), e estruturas de consenso de V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> humanas (k1 hum, kappa leve subgrupo I; humIII, subgrupo III pesado) (ID SEQ N<sup>os</sup> 5 e 6, respectivamente). Os asteriscos identificam diferenças entre os domínios variáveis de pertuzumabe e anticorpo monoclonal de ratos 2C4 ou entre domínios variáveis de pertuzumabe e a estrutura humana. As Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs) estão em colchetes.

As Figuras 3A e 3B mostram as sequências de aminoácidos de cadeia leve de pertuzumabe (Fig. 3A; ID SEQ N<sup>o</sup> 7) e cadeia pesada (Fig. 3B; ID SEQ N<sup>o</sup> 8). As CDRs são mostradas em negrito. As massas moleculares calculadas da cadeia leve e da cadeia pesada são 23.526,22 Da e 49.216,56 Da (cisteínas na forma reduzida). A porção de carboidrato é anexada a Asn 299 da cadeia pesada.

As Figuras 4A e 4B mostram as sequências de aminoácidos da cadeia leve (Fig. 4A; ID SEQ N<sup>o</sup> 9) e cadeia pesada (Fig. 4B; ID SEQ N<sup>o</sup> 10) de trastuzumabe, respectivamente.

10 As Figuras 5A e 5B descrevem uma sequência de cadeia leve de pertuzumabe (Fig. 5A; ID SEQ N<sup>o</sup> 11) e uma sequência de cadeia pesada de pertuzumabe variante (Fig. 5B; ID SEQ N<sup>o</sup> 12), respectivamente.

15 A Figura 6 mostra Concentrações de Pertuzumabe em Soro ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os primeiros 84 dias (através do Dia de Estudo 85) para Estudos TOC2689g e BO16934.

### Descrição Detalhada das Modalidades Preferenciais

#### I. Definições

20 Os termos "terapia biológica" e "imunoterapia" são usados aqui de forma intercambiável e se referem a tratamentos contra câncer utilizando o sistema imunológico do corpo para lutar contra o câncer, sem considerar seu mecanismo de ação. A terapia biológica especificamente inclui tratamento com anticorpos.

25 O termo "quimioterapia" como usado aqui se refere a tratamento compreendendo a administração de um agente quimioterápico, como definido abaixo.

"Sobrevida" se refere à vida restante do paciente, e inclui a sobrevida global bem como a sobrevida livre de progressão.

30 "Sobrevida global" ou "OS" se refere à vida restante do paciente por um período definido de tempo, tal como 1 ano, 5 anos, etc. a partir da hora do diagnóstico ou tratamento. Para os propósitos do exame clínico descrito nos exemplos, a sobrevida global (OS) é definida como o tempo a partir da data de randomização da população de pacientes até a data de morte por

qualquer causa.

"Sobrevida livre de progressão" ou "PFS" refere-se à vida restante do paciente, sem a progressão do câncer ou ficando pior. Para o propósito do exame clínico descrito nos exemplos, a sobrevivida livre de progressão (PFS) é definida como o tempo a partir da randomização da população de estudo à primeira doença progressiva documentada, ou morte por qualquer causa, o que ocorrer primeiro. A progressão da doença pode ser documentada por quaisquer métodos clinicamente aceitos, tal como, por exemplo, doença progressiva radiográfica, como determinado por Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Therasse e outros, *J Natl Ca Inst* 2000; 92(3):205-216), meningite carcinomatosa diagnosticada por avaliação citológica de fluido espinhal cerebral, e/ou fotografia médica para monitorar recorrências na parede torácica de lesões subcutâneas.

Por "sobrevida estendida" entende-se sobrevivida livre de progressão ou total aumentada em um paciente tratado de acordo com a presente invenção, em relação a um paciente não tratado e/ou em relação a um paciente tratado com um ou mais agentes antitumor aprovados, mas não recebendo tratamento de acordo com a presente invenção. Em um exemplo particular, "sobrevida estendida" significa sobrevivida livre de progressão (PFS) e/ou sobrevivida global (OS) de pacientes com câncer de mama recebendo a terapia de combinação da presente invenção (por exemplo, tratamento com uma combinação de um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítopo 2C4, um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno, por exemplo, pertuzumabe + trastuzumabe + docetaxel) em relação a pacientes tratados com um anticorpo contra HER2 essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno, por exemplo, trastuzumabe + docetaxel, na ausência de um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítopo 2C4, isto é, pertuzumabe.

Aqui, "tempo para progressão de doença" ou "TTP" refere-se ao tempo, geralmente medido em semanas ou meses, a partir do tempo de tratamento inicial até o progresso do câncer ou que piore. Tal progressão pode ser avaliada pelo médico versado na técnica. A progressão da doença pode

ser avaliada e documentada por quaisquer métodos aceitos clinicamente, tal como, por exemplo, doença progressiva radiográfica, como determinado por Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Therasse e outros, *J Natl Ca Inst* 2000; 92(3):205-216), meningite carcinomatosa diagnosticada por avaliação citológica de fluido espinal cerebral, e/ou fotografia médica para monitorar recorrências de parede torácica de lesões subcutâneas.

Por "TTP estendida" significa aumentar o tempo para progressão da doença em um paciente tratado de acordo com a presente invenção em relação a um paciente não tratado e/ou em relação a um paciente tratado com um ou mais agentes antitumor aprovados, mas não recebendo tratamento de acordo com a presente invenção. Em um exemplo particular, "TTP estendida" significa tempo para progressão da doença de pacientes com câncer de mama recebendo a terapia de combinação da presente invenção (tratamento com uma combinação de um anticorpo de HER2 se ligando essencialmente ao epítipo 2C4, um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítipo 4D5, e um taxeno, por exemplo, pertuzumabe + trastuzumabe + docetaxel) em relação a pacientes tratados com um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítipo 4D5, e um taxeno, por exemplo, trastuzumabe + docetaxel, na ausência de um anticorpo contra HER2 ligando essencialmente ao epítipo 2C4, isto é, pertuzumabe.

Uma "resposta objetiva" refere-se a uma resposta medida, incluindo a resposta completa (RC) ou resposta parcial (RP).

Por "resposta completa" ou "RC" entende-se o desaparecimento de todos os sinais de câncer em resposta a tratamento. Isso nem sempre significa que o câncer foi curado.

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

"Receptor de HER" é um receptor de proteína tirosina quinase que pertence à família de receptor de HER e inclui receptores de EGFR, HER2, HER3 e HER4. O receptor de HER geralmente compreenderá um domínio extracelular, que pode ligar um ligante HER e/ou dimerizar com outra

molécula de receptor de HER; um domínio de transmembrana lipofílica; um domínio de tirosina quinase intracelular conservado; e um terminal carboxila sinalizando domínio abrigando vários resíduos de tirosina que podem ser fosforilados. O receptor de HER pode ser um receptor de HER de "sequência nativa" ou uma "sequência de aminoácido variante" desse. Preferencialmente, o receptor de HER é receptor de HER humano de sequência nativa.

Os termos "ErbB1", "HER1", "receptor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são usados de forma intercambiável aqui e se referem a EGFR como descrito, por exemplo, em Carpenter *e outros*, *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), incluindo formas mutantes naturalmente ocorrendo desses (por exemplo, um EGFR mutante de apagamento como em Humphrey *e outros*, *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* refere-se ao gene codificando o produto de proteína EGFR.

As expressões "ErbB2" e "HER2" são usadas de forma intercambiável aqui e se referem a proteína HER2 humana descrita, por exemplo, em Semba *e outros*, *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto *e outros*, *Nature* 319:230-234 (1986) (número de acesso ao Genbank X03363). O termo "*erbB2*" refere-se ao gene codificando ErbB2 humano e "*neu*" se refere ao gene codificando p185<sup>neu</sup> de ratos. A HER2 preferencial é HER2 humano de sequência nativa.

Aqui, "domínio extracelular de HER2" ou "ECD de HER2" refere-se a um domínio de HER2 que está fora de uma célula, ou ancorado a uma membrana celular, ou em circulação, incluindo fragmentos dessa. A sequência de aminoácido de HER2 é mostrada na Figura 1. Em uma modalidade, o domínio extracelular de HER2 pode compreender quatro domínios: "Domínio I" (resíduos de aminoácidos de aproximadamente 1-195; SEQ ID Nº 14), "Domínio II" (resíduos de aminoácidos de aproximadamente 196-319; ID SEQ Nº 15), "Domínio III" (resíduos de aminoácidos de aproximadamente 320-488; ID SEQ Nº 16), e "Domínio IV" (resíduos de aminoácidos de aproximadamente 489-630; ID SEQ Nº 17) (numeração de resíduo sem peptídeo sinal). Vide Garrett *e outros*, *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *e outros*, *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *e outros*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004), e

Plowman e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), bem como a Fig. 6 aqui.

"ErbB3" e "HER3" referem-se ao polipeptídeo receptor como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus e outros, *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

Os termos "ErbB4" e "HER4" aqui se referem ao polipeptídeo receptor como descrito, por exemplo, em Pedido de Patente EP Nº 599.274; Plowman e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); e Plowman e outros, *Nature*, 366:473-475 (1993), incluindo isoformas dessas, por exemplo, como descrito em WO 99/19488, publicado em 22 de Abril de 1999.

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

EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4, e heregulinas.

"Heregulina" (HRG) quando usado aqui se refere a um polipeptídeo codificado pelo produto de gene heregulina como descrito na Patente U.S. Nº 5.641.869, ou Marchionni e outros, *Nature*, 362:312-318 (1993). Os  
5 exemplos de heregulinas incluem heregulina- $\alpha$ , heregulina- $\beta$ 1, heregulina- $\beta$ 2 e heregulina- $\beta$ 3 (Holmes e outros, *Science*, 256:1205-1210 (1992); e Patente U.S. Nº 5.641.869); fator de diferenciação *neu* (NDF) (Peles e outros, *Cell* 69: 205-216 (1992)); atividade de indução de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls e outros, *Cell* 72:801-815 (1993)); fatores de crescimento de glia (GGFs)  
10 (Marchionni e outros, *Nature*, 362:312-318 (1993)); fator derivado de neurônio sensorial e motor (SMDF) (Ho e outros, *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995));  $\gamma$ -heregulina (Schaefer e outros, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)).

Um "dímero de HER" aqui é um dímero associado não covalentemente compreendendo ao menos dois receptores de HER. Tais complexos  
15 podem se formar quando uma célula expressando dois ou mais receptores de HER é exposta a um ligante de HER e pode ser isolada por imunoprecipitação e analisada por SDS-PAGE como descrito em Sliwkowski e outros, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), por exemplo. Outras proteínas, tais como uma subunidade de receptor de citoquina (por exemplo, gp130)  
20 podem ser associadas com o dímero. Preferencialmente, o dímero de HER compreende HER2.

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

Um "anticorpo contra HER" é um anticorpo que se liga a um receptor HER. Opcionalmente, o anticorpo contra HER adicionalmente interfere na ativação ou função da HER. Preferencialmente, o anticorpo contra HER se liga ao receptor HER2. Os anticorpos contra HER2 de interesse aqui são pertuzumabe e trastuzumabe.

"Ativação de HER" refere-se à ativação, ou fosforilação, de quaisquer um ou mais receptores HER. Geralmente, a ativação de HER resulta em transdução de sinal (por exemplo, a causada por um domínio de

quinase intracelular de um receptor HER fosforilando resíduos de tirosina no receptor de HER ou um polipeptídeo de substrato). A ativação de HER pode ser mediada pelo ligante de HER se ligando a um dímero de HER compreendendo o receptor HER de interesse. O ligante de HER ligando-se a um

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

10 "Fosforilação" refere-se à adição de um ou mais grupo(s) fosfato a uma proteína, tal como um receptor HER, ou substrato desse.

Um anticorpo que "inibe a dimerização de HER" é um anticorpo que inibe, ou interfere com a formação de um dímero de HER. Preferencialmente, tal anticorpo se liga à HER2 no sítio de ligação heterodimérica dessa.

15 O anticorpo de inibição de dimerização mais preferencial aqui é pertuzumabe ou MAb 2C4. Outros exemplos de anticorpos que inibem a dimerização de HER incluem anticorpos que se ligam a EGFR e inibem a dimerização desse com um ou mais outros receptores HER (por exemplo, anticorpo monoclonal EGFR 806, MAb 806, que se liga a EGFR ativado ou "não ligado";

20 vide Johns *e outros*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); anticorpos que se ligam a HER3 e inibem a dimerização dessa com um ou mais outros receptores HER; e anticorpos que se ligam a HER4 e inibem a dimerização dessa com um ou mais outros receptores HER.

Um "inibidor de dimerização de HER2" é um agente que inibe a

25 formação de um dímero ou heterodímero compreendendo HER2.

Um "sítio de ligação heterodimérica" em HER2, refere-se a uma região no domínio extracelular de HER2 que contata, ou está voltada para uma região no domínio extracelular de EGFR, HER3 ou HER4 mediante a formação de um dímero com esses. A região é encontrada no Domínio II de

30 HER2 (ID SEQ No: 15). Franklin *e outros*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

O anticorpo contra HER2 que "se liga a um sítio de ligação heterodimérica" de HER2, se liga a resíduos no Domínio II (ID SEQ No: 15) e

opcionalmente também se liga a resíduos em outros dos domínios do domínio extracelular de HER2, tal como os domínios I e III, ID SEQ Nos: 14 e 16, e pode impedir de forma estérica, ao menos a alguma extensão, a formação de um heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3, ou HER2-HER4. Franklin e outros, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004) caracterizam a estrutura cristal de pertuzumabe-HER2, depositada com o Banco de Dados de Proteína RCSB (Código ID IS78), ilustrando um anticorpo exemplificado que se liga ao sítio de ligação heterodimérica de HER2.

Um anticorpo que "se liga ao domínio II" de HER2 se liga a resíduos no domínio II (ID SEQ No: 15) e opcionalmente resíduos em outros domínios de HER2, tal como os domínios II e III (ID SEQ Nos: 14 e 16, respectivamente). Preferencialmente, o anticorpo que se liga ao domínio II se liga à junção entre os domínios I, II e III de HER2.

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

Aqui, uma amostra ou célula que "expressa" uma proteína de interesse (tal como um receptor HER ou ligante de HER) é uma na qual mRNA codificando a proteína, ou a proteína, incluindo fragmentos dela, é determinado como estando presente na amostra ou célula.

A técnica de "reação em cadeia de polimerase" ou "PCR" como usada aqui geralmente se refere a um procedimento onde quantidades de minutos de uma parte específica de ácido nucléico, RNA e/ou DNA, são amplificadas como descrito na Patente U.S. Nº 4.683.195 emitida em 28 de Julho de 1987. Geralmente, a informação de sequência a partir das extremidades da região de interesse ou além das necessidades disponíveis, tal que os iniciadores de oligonucleotídeo possam ser projetados; esses iniciadores serão idênticos ou similares em sequência a filamentos opostos do modelo a ser amplificado. Os nucleotídeos de terminal 5 dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. PCR pode ser usado para amplificar sequência de RNA específicas, sequências de DNA específicas de DNA genômico total, e cDNA transcrito de RNA celular total, sequências de plasmídeo ou bacteriófago, etc. Vide geralmente Mullis e outros,

*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Como usado aqui, PCR é considerado como sendo um, mas não somente o único, exemplo de um método de reação de polimerase de ácido nucléico para amplificar uma amostra teste

5 de ácido nucléico, compreendendo o uso de um ácido nucléico conhecido (DNA ou RNA) como um iniciador e utiliza uma polimerase de ácido nucléico para amplificar ou gerar uma parte específica de ácido nucléico ou para amplificar ou gerar uma parte específica de ácido nucléico que é complementar a um ácido nucléico particular.

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

15 O termo "microarranjo" refere-se a um arranjo ordenado de elementos de arranjo hibridizável, preferencialmente provas de polinucleotídeo, em um substrato.

O termo "polinucleotídeo", quando usado no singular ou plural, geralmente refere-se a qualquer polirribonucleotídeo ou polidesoxirribonucleotídeo, que pode ser RNA ou DNA não modificado ou RNA ou DNA modificado. Assim, por exemplo, polinucleotídeos como definido aqui incluem, sem limitação, DNA de filamento único e de filamento duplo, DNA incluindo regiões de filamento único e de filamento duplo, RNA de filamento único e de filamento duplo, e RNA incluindo regiões de filamento único e de filamento

20 duplo, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que podem ser de filamento único ou, mais tipicamente, de filamento duplo ou incluem regiões de filamento único e de filamento duplo. Em adição, o termo "polinucleotídeo" como usado aqui se refere a regiões de filamento triplo compreendendo

25 RNA ou DNA ou ambos RNA e DNA. Os filamentos em tais regiões podem ser da mesma molécula ou de diferentes moléculas. As regiões podem incluir todas de uma ou mais das moléculas, mas mais tipicamente envolvem somente uma

30 região de algumas das moléculas. Uma das moléculas de uma região heli-

coidal tripla frequentemente é um oligonucleotídeo. O termo "polinucleotídeo" especificamente inclui cDNAs. O termo inclui DNAs (incluindo cDNAs) e RNAs que contêm uma ou mais bases modificadas. Assim, DNAs ou RNAs com cadeias principais modificadas para estabilidade ou para outras razões são "polinucleotídeos" como este termo pretende aqui. Além disso, DNAs ou RNAs compreendendo bases incomuns, tal como inosina, ou bases modificadas, tal como bases tritiadas, são incluídas no termo "polinucleotídeos" como definido aqui. Em geral, o termo "polinucleotídeo" abrange todas as formas química, enzimática e/ou metabolicamente modificadas de polinucleotídeos não modificados, bem como as formas químicas de DNA e RNA característicos de vírus e células, incluindo células simples e complexas.

O termo "oligonucleotídeo" refere-se a um polinucleotídeo relativamente curto, incluindo, sem limitação, desoxirribonucleotídeos de filamento único, ribonucleotídeos de filamento único ou de filamento duplo, híbridos RNA:DNA e DNAs de filamento duplo. Os oligonucleotídeos, tal como os oligonucleotídeos de prova de DNA de filamento único, são frequentemente sintetizados por métodos químicos, por exemplo, usando sintetizadores de oligonucleotídeo automatizados que estão comercialmente disponíveis. Entretanto, os oligonucleotídeos podem ser obtidos por uma variedade de outros métodos, incluindo técnicas mediadas por DNA recombinante in vitro e por expressão de DNAs em células e organismos.

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

A "Estringência" de reações de hibridização é prontamente determinada por um versado na técnica, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da prova, temperatura de lavagem, e concentração de sal. Em geral, provas mais longas exigem temperaturas mais altas para anelamento apropriado, enquanto provas mais curtas necessitam de

temperaturas mais baixas. A hibridização geralmente depende da capacidade do DNA desnaturado para reanelar quando filamentos complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto mais alto o grau de homologia desejado entre a prova e a sequência de hibridização, mais alta a temperatura relativa que pode ser usada. Como um resultado, segue que temperaturas relativas mais altas tenderiam a tornar as condições de reação mais estringentes, enquanto temperatura mais baixas tenderiam a tornar as condições de reação menos estringentes. Para detalhes e explicação adicionais de estringência de reações de hibridização, vide Ausubel e outros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições estringentes" ou "condições de alta estringência", como definido aqui, tipicamente: (1) empregar baixa resistência iônica e alta temperatura para lavagem, por exemplo, cloreto de sódio a 0,015 M / citrato de sódio a 0,0015 M / 0,1% de dodocil sulfato de sódio a 50°C; (2) empregar durante a hibridização um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (v/v) de formamida com 0,1% de albumina de soro bovino / 0,1% de Ficoll / 0,1% de polivinilpirrolidona / 50 mM de tampão de fosfato de sódio em pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C; ou (3) empregar 50% de formamida, SSC 5x (NaCl a 0,75 M, citrato de sódio a 0,075 M), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, solução de Denhardt 5x, DNA de esperma de salmão sonificado (50 &ggr;g/ml), 0,1% SDS, e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2xSSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguido por uma lavagem de alta estringência de 0,1xSSC contendo EDTA a 55°C.

"Condições moderadamente estringentes" podem ser identificadas como descrito por Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem o uso de solução de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, resistência iônica e % SDS) menos estringentes que aquelas descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente estringentes é incubação

noturna a 37°C em uma solução compreendendo: 20% de formamida, SSC 5x (NaCl a 150 mM, citrato de trisódio de 15 mM), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano, e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão fragmentado desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em SSC 1x em aproximadamente 37 – 50°C. O versado na técnica reconhecerá como ajustar a temperatura, resistência iônica, etc. como necessário para acomodar fatores tais como comprimento de prova e seus similares.

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

O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e especificamente cobre anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

O termo "anticorpo monoclonal" como usado aqui se refere a um anticorpo de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos e/ou ligam o mesmo epítopo(s), exceto por possíveis variantes que podem aparecer durante a produção de anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em menores quantidades. Tal anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo compreendendo uma sequência de polipeptídeo que liga um alvo, onde a sequência de polipeptídeo de ligação a alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma única sequência de polipeptídeo de ligação alvo a partir de uma pluralidade de sequências de polipeptídeo. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um clone exclusivo de uma pluralidade de clones, tal como uma piscina de clo-

nes de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinante. Dever-se-ia entender que a sequência de ligação alvo selecionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para aperfeiçoar a afinidade para o alvo, para humanizar a sequência de ligação alvo, para aperfeiçoar sua produção em cultura celular, para reduzir sua imunogenicidade in vivo, para criar um anticorpo multiespecífico, etc., e que um anticorpo compreendendo a sequência de ligação alvo alterada é também um anticorpo monoclonal dessa invenção. Em contraste a preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante em um antígeno. Em adição a sua especificidade, as preparações de anticorpo monoclonal são vantajosas, uma vez que elas são tipicamente não contaminadas por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não como sendo interpretado como exigindo produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser obtidos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo, Kohler e outros, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow e outros, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling e outros, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.816.567), tecnologias de exibição de fagos (vide, por exemplo, Clackson e outros, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu e outros, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee e outros, *J.Mol.Biol.*340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); e Lee e outros, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), e tecnologias para produzir anticorpos tipo humanos ou humanos em animais que têm partes ou todas as sequências de imunoglobulina humana de codificação de genes ou locais de imunoglobulina humana

(vide, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann e outros, *Year in Immu* N<sup>o</sup>, 7:33 (1993); Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.545.807; WO 1997/17852; Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016; Marks e outros, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg e outros, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild e outros, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)).

Os anticorpos monoclonais aqui especificamente incluem anticorpos "quiméricos" nos quais uma parte da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse de anticorpos particular, enquanto o restante da cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. N<sup>o</sup> 4.816.567; e Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos "primatizados" compreendendo sequências de ligação com antígeno de domínio variável derivadas de um primata não-humano (por exemplo, Macaco do Mundo Velho, Macacos da família dos Pongídeos, etc.) e sequências de região constante humanas, bem como anticorpos "humanizados".

As formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, de roedores) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo do receptor) nas quais resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não-humana (anti-

corpo do doador) tal como camundongo, rato, ou primata não-humano tendo a especificidade desejada, afinidade e capacidade. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura (RE) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo do receptor ou no anticorpo do doador. Essas modificações são feitas para adicionalmente refinar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de ao menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os laços hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todos ou substancialmente todas as REs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá ao menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones *e outros*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *e outros*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Os anticorpos contra HER2 humanizados incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 ou trastuzumabe (HERCEPTIN<sup>®</sup>) como descrito na Tabela 3 da Patente U.S. 5.821.337 expressamente incorporada aqui por referência; 520C9 humanizado (WO93/21319); e anticorpos 2C4 humanizados tal como pertuzumabe como descrito aqui.

Para os propósitos aqui citados, "trastuzumabe," "HERCEPTIN<sup>®</sup>," e "huMAb4D5-8" se referem a um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácido de cadeia leve e pesada em ID SEQ N<sup>os</sup> 9 e 10, respectivamente.

Aqui, "pertuzumabe" e "OMNITARG<sup>®</sup>" se referem a um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácido de cadeia leve e pesada nos ID SEQ N<sup>os</sup> 7 e 8, respectivamente.

Um "anticorpo intacto" aqui citado é um que compreende duas regiões de ligação com antígeno, e uma região Fc. Preferencialmente, o an-

ticorpo intacto tem uma região Fc funcional.

"Fragmentos de anticorpo" compreende uma parte de um anticorpo intacto, preferencialmente compreendendo a região de ligação com antígeno desse. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmento(s) de anticorpos.

Os "anticorpos nativos" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dáltons, compostos de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (P) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfídeo covalente, enquanto o número de ligações dissulfídeo varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótopos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem pontes dissulfídeo intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (VH) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (VL) e um domínio constante em sua outra extremidade. O domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Crê-se que os resíduos de aminoácidos particulares formam uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

O termo "variável" refere-se ao fato de que certas partes dos domínios variáveis diferem extensivamente em sequência entre anticorpos e são usados na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. Entretanto, a variabilidade não é regularmente distribuída por todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis ambas nos domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada. As partes conservadas mais altamente de domínios variáveis são chamadas as regiões de estrutura (REs). Cada um dos domínios variáveis de cadeias pesada e leve nativas compreende quatro REs, amplamente adotando uma configuração de folha β, conectada

por três regiões hipervariáveis, que formam laços conectando, e em alguns casos formando parte da estrutura de folha  $\beta$ . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade pelas REs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação com antígeno de anticorpos (vide Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não são envolvidos diretamente em ligar um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tal como a participação do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

O termo "região hipervariável" quando usado aqui se refere aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação com antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácido de uma "região de determinação de complementaridade" ou "CDR" (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (P1), 50-65 (P2) e 95-102 (P3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "laço hipervariável" (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (P1), 53-55 (P2) e 96-101 (P3) domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Os resíduos de "Região de estrutura" ou "RE" são aqueles resíduos de domínio variável além dos resíduos de região hipervariável como aqui definido.

A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação com antígeno, chamados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação com antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina produz um fragmento  $F(ab')_2$  que tem dois sítios de ligação com antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento de antígeno completo e de ligação com antígeno. Essa re-

gião consiste em um dímero de um domínio de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação não covalente estreita. Está nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação com antígeno na superfície do dímero VH-V<sub>L</sub>. Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação com antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo somente três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar o antígeno, embora em uma afinidade mais baixa do que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos no término carbóxi do domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de junção de anticorpos. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' no qual o resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes produz ao menos um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo F(ab')<sub>2</sub> foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas de junção entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, chamados kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), baseado nas sequências de aminoácido de seus domínios constantes.

O termo "região Fc" aqui é usado para definir uma região de terminal C de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina devam variar, a região Fc de cadeia pesada IgG humana é usualmente definida como estirando a partir de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou a partir de Pro230, ao término carboxila desses. A lisina de terminal C (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, duran-

te a produção ou purificação do anticorpo, ou elaborando de forma recombinante o ácido nucléico codificando uma cadeia pesada do anticorpo. Consequentemente, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpos com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpos sem resíduos K447 removidos, e populações de anticorpos tendo uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447.

A menos que de outra forma indicado, aqui a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada de imunoglobulina é a do índice EU como em Kabat *e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), expressamente incorporado aqui por referência. O "índice EU como em Kabat" refere-se à numeração de resíduo do anticorpo EU IgG1 huma N<sup>o</sup>

Uma "região Fc funcional" possui uma "função efetora" de uma região Fc de sequência nativa. As "funções efetoras" exemplificadas incluem ligação C1q; citotoxicidade dependente de complemento; ligação de receptor Fc; citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose, regulação de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor de célula B, BCR), etc. Tais funções efetoras geralmente exigem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser avaliadas usando vários ensaios como aqui descritos, por exemplo.

Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma sequência de aminoácido idêntica à sequência de aminoácido de uma região Fc encontrada na natureza. As regiões Fc humanas de sequência nativa incluem uma região Fc IgG1 humana de sequência nativa (alótipos A e não -A), região Fc IgG2 humana de sequência nativa, região Fc IgG3 humana de sequência nativa, e região Fc IgG4 humana de sequência nativa, bem como variantes dessas ocorrendo naturalmente.

Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácidos que difere daquela de uma região Fc de sequência nativa em virtude de ao menos uma modificação de aminoácido, preferencialmente uma ou mais substituições de aminoácido. Preferencialmente, a região Fc variante

tem ao menos uma substituição de aminoácido comparada a uma região Fc de sequência nativa ou à região Fc de um polipeptídeo pai, por exemplo, de aproximadamente uma a aproximadamente dez substituições de aminoácido, e preferencialmente, de aproximadamente uma a aproximadamente cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo pai. A região Fc variante aqui possuirá preferencialmente ao menos aproximadamente 80% de homologia com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo pai, e mais preferencialmente ao menos aproximadamente 90% de homologia com elas, mais preferencialmente ao menos aproximadamente 95% de homologia com elas.

Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos intactos podem ser atribuídos a diferentes "classes". Há cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias dessas podem ser adicionalmente divididas em "subclasses" (isotipo), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , e  $\mu$ , respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem-conhecidas.

Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de anticorpos, sendo que esses domínios estão presentes em uma cadeia única de polipeptídeos. Preferencialmente, o polipeptídeo Fv adicionalmente compreende um ligador de polipeptídeo entre os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> que habilita o scFv a formar a estrutura desejada para a ligação com antígeno. Para revisão de scFv, vide Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Os fragmentos scFv de anticorpo contra HER2 são descritos em WO93/16185; Patente U.S. Nº 5.571.894 e Patente U.S. Nº 5.587.458.

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação com antígeno, fragmentos que compreen-

dem um domínio pesada variável (VH) conectado a um domínio leve variável (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH – VL). Usando-se um ligador que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação com antígeno. Os diacórcos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Um "anticorpo nu" é um anticorpo que não é conjugado a uma molécula heteróloga, tal como uma porção citotóxica ou radioetiqueta.

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Os componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interfeririam com usos diagnósticos e terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínicos ou não-proteínicos. Em modalidades preferenciais, o anticorpo será purificado (1) para mais de 95% do peso de anticorpo como determinado pelo método Lowry, e mais preferencialmente, mais de 99% do peso, (2) a um grau suficiente para obter ao menos 15 resíduos de sequência de aminoácido interna ou de terminal N pelo uso de um sequenciador de recipiente giratório, ou (3) a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul de Coomassie ou, preferencialmente, coloração prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo in situ nas células recombinantes desde que ao menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por ao menos uma etapa de purificação.

Um anticorpo "de afinidade madura" é um com uma ou mais alterações em uma ou mais regiões hipervariáveis desse que resultam em melhorar a afinidade do anticorpo com o antígeno, comparado a um anticorpo pai que não possui essas alterações. Os anticorpos de afinidade madura preferenciais terão afinidades nanomolares ou até picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos de afinidade madura são produzidos por procedi-

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

O termo "anticorpo de espécie principal" aqui se refere à estrutura do anticorpo em uma composição que é a molécula de anticorpo quantitativamente predominante na composição. Em uma modalidade, o anticorpo de espécie principal é um anticorpo contra HER2, tal como o anticorpo que se liga ao Domínio II de HER2, anticorpo que inibe a dimerização de HER mais eficazmente do que o trastuzumabe, e/ou um anticorpo que se liga a um sítio de ligação heterodimérica de HER2. A modalidade preferencial aqui do anticorpo de espécie principal é uma compreendendo as sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada variáveis de ID SEQ N<sup>os</sup> 3 e 4, e mais preferencialmente, compreendendo as sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada de ID SEQ N<sup>os</sup> 7 e 8 (pertuzumabe).

Um anticorpo "de sequência de aminoácido variante" aqui citado é um anticorpo com uma sequência de aminoácido que difere de um anticorpo de espécie principal. Normalmente, as variantes de sequência de aminoácido possuirão ao menos aproximadamente 70% de homologia com o anticorpo de espécie principal, e preferencialmente, elas serão ao menos aproximadamente 80%, mais preferencialmente ao menos aproximadamente 90% homólogas ao anticorpo de espécie principal. As variantes de sequência de aminoácido possuem substituições, apagamentos, e/ou adições em certas posições dentro ou adjacente à sequência de aminoácido do anticorpo de espécie principal. Exemplos de variantes de sequência de aminoácido aqui citados incluem uma variante ácida (por exemplo, variante de anticorpo deamidado), uma variante básica, um anticorpo com uma extensão guia de terminal amino (por exemplo, VHS-) em uma ou duas cadeias leves desse, um anticorpo com um resíduo de lisina de terminal C em uma ou duas ca-

deias pesadas desse, etc., e inclui combinações de variações nas sequências de aminoácido de cadeias pesadas e/ou leves. A variante de anticorpo de particular interesse aqui é o anticorpo compreendendo uma extensão guia de terminal amino em uma ou duas cadeias leves desse, opcionalmente  
5 ademais compreendendo outras sequências de aminoácido e/ou diferenças de glicosilação em relação ao anticorpo de espécie principal.

Um anticorpo de "variante de glicosilação" aqui citado é um anticorpo com uma ou mais porções de carboidrato anexadas a esse que diferem de uma ou mais porções de carboidrato anexadas a um anticorpo de  
10 espécie principal. Exemplos de variantes de glicosilação aqui citadas incluem anticorpo com uma estrutura de oligossacarídeo G1 ou G2, ao invés de uma estrutura de oligossacarídeo G0, anexadas a uma região Fc desse, anticorpo com uma ou duas porções de carboidrato anexadas a uma ou duas cadeias leves desse, anticorpo sem carboidrato anexado a uma ou duas ca-  
15 deias pesadas do anticorpo, etc., e combinações de alterações de glicosilação.

Quando o anticorpo tem uma região Fc, uma estrutura de oligossacarídeo pode ser anexada a uma ou duas cadeias pesadas do anticorpo, por exemplo, no resíduo 299 (298, numeração EU de resíduos). Para pertuzumabe, G0 era a estrutura de oligossacarídeo predominante, com outras  
20 estruturas de oligossacarídeo tais como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) e G2 sendo encontradas em menores quantidades na composição de pertuzumabe.

A menos que de outra forma indicado, uma "estrutura de oligossacarídeo G1" aqui citada inclui estruturas G-1, G1-1, G1(1-6) e G1(1-3).  
25

Uma "extensão guia de terminal amino" aqui citada refere-se a um ou mais resíduos de aminoácido da sequência guia de terminal amino que estão presentes no término amino de quaisquer uma ou mais cadeias pesadas ou leves de um anticorpo. Uma extensão guia de terminal amino  
30 exemplificada compreende ou consiste em três resíduos de aminoácido, VHS, presentes em uma ou ambas as cadeias leves de uma variante de anticorpo.

Um anticorpo "deaminado" é um que um ou mais resíduos de asparagina desse foram derivatizados, por exemplo, a um ácido aspártico, uma succinimida, ou um ácido isoaspártico.

Os termos "câncer" e "canceroso" referem-se ou descrevem a  
5 condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. O câncer tratado de acordo com a presente invenção é qualquer tipo de câncer de mama de HER2 positivo metástico, incluindo, sem limitação, qualquer adenocarcinoma histológica ou citologica-  
10 (onde a doença localmente recorrente não é amenizável para resseção com intenção curativa), carcinoma ductal metástico de HER2 positivo, carcinoma lobular metástico de HER2 positivo, especificamente incluindo ambos cânceres de mama de ER positivo e de ER negativo, e podem, mas não são exigidos a, expressar outros receptores HER, tal como EGFR e/ou HER3 e/ou  
15 HER4 e/ou um ou mais ligantes de HER.

Um câncer "avançado" é um que se difundiu fora do sítio ou órgão de origem, ou por invasão local ou metástase.

Um câncer "refratário" é um que progride mesmo através de um agente antitumor, tal como um agente quimioterápico, que está sendo administrado ao paciente com câncer. Um exemplo de um câncer refratário é um  
20 que é refratário à platina.

Um câncer "recorrente" é um que cresceu novamente, ou no sítio inicial ou em um sítio distante, depois de uma resposta à terapia inicial.

Aqui, um "paciente" é um paciente humano. O paciente pode ser  
25 um "paciente com câncer", isto é, um que está sofrendo ou em risco de sofrer de um ou mais sintomas de câncer.

Uma "amostra de tumor" aqui citada é uma amostra derivada de, ou compreendendo células tumorais a partir de um tumor de pacientes, incluindo câncer, como definido acima. Exemplos de amostras de tumor aqui  
30 citadas incluem, mas não estão limitadas a, biópsias de tumor, células tumorais circulantes, proteínas de plasma circulantes, fluido ascítico, culturas de células primárias ou linhas celulares derivadas de tumores ou exibindo pro-

priedades similares ao tumor, bem como amostras de tumor preservadas, tal como amostras de tumor fixadas por formalina, embutidas em parafina ou amostras de tumor congeladas.

5 Uma amostra de tumor "fixa" é uma que foi histologicamente preservada usando um fixador.

Uma amostra de tumor "fixada com formalina" é uma que foi preservada usando formaldeído como o fixador.

10 Uma amostra de tumor "embutida" é uma circundada por um meio geralmente firme e rígido tal como parafina, cera, celoidina, ou uma resina. O embutimento torna possível o corte de finas seções para exame microscópico ou para a geração de microarranjos de tecidos (TMAs).

Uma amostra de tumor "embutida em parafina" é uma circundada por uma mistura purificada de hidrocarbonetos sólidos derivados de petróleo.

15 Aqui, uma amostra de tumor "congelada" refere-se a uma amostra de tumor que está, ou foi, congelada.

20 Uma amostra biológica ou de câncer que "exibe expressão, amplificação ou ativação de HER" é uma que, em um teste de diagnóstico, expressa (incluindo superexpressa) um receptor HER, tem gene de HER amplificado, e/ou de outra forma demonstra ativação ou fosforilação de um receptor HER.

25 Uma amostra biológica ou de câncer que "exibe ativação de HER" é uma que, em um teste de diagnóstico demonstra ativação ou fosforilação de um receptor HER. Tal ativação pode ser determinada diretamente (por exemplo, medindo-se a fosforilação de HER por ELISA) ou indiretamente (por exemplo, por perfil de expressão de gene ou apagando heterodímeros de HER, como descrito aqui).

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

Um "ensaio fosfo-ELISA" aqui citado é um ensaio no qual a fosforilação de um ou mais receptores HER, especialmente HER2, é avaliada

em um ensaio imunoabsorvente ligado à enzimas (ELISA) usando um reagente, usualmente um anticorpo, para detectar receptor HER fosforilado, substrato, ou molécula de sinalização descendente. Preferencialmente, um anticorpo que detecta HER2 fosforilada é usado. O ensaio pode ser executado em lisatos de células, preferencialmente a partir de amostras biológicas frescas ou congeladas.

Uma célula de câncer com "superexpressão ou amplificação de receptor HER" é um que tem níveis significativamente altos de uma proteína ou gene de receptor HER comparado a uma célula não-cancerosa do mesmo tipo de tecido. Tal superexpressão pode ser causada por amplificação de gene ou por transcrição ou tradução aumentada. A superexpressão ou amplificação de receptor HER pode ser determinada em um ensaio diagnóstico ou prognóstico avaliando-se níveis aumentados da proteína HER presente na superfície de uma célula (por exemplo, via um ensaio de imunohistoquímica, IHC). Alternativamente, ou adicionalmente, um pode medir níveis de ácido nucléico codificando HER na célula, por exemplo, via hibridização in situ fluorescente (FISH; vide /45479 publicado em Outubro de 1998), southern blotting, ou técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), tal como PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). Um pode estudar superexpressão ou amplificação de receptor HER medindo antígeno disperso (por exemplo, domínio extracelular de HER) em um fluido biológico tal como soro (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.933.294 emitida em 12 de Junho de 1990; WO 91/05264 publicada em 18 de abril de 1991; Patente U.S. 5.401.638 emitida em 28 de Março de 1995; e Sias e outros, *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). À parte dos ensaios acima, vários ensaios in vivo estão disponíveis ao profissional versado na técnica. Por exemplo, um pode expor células no corpo do paciente a um anticorpo que é opcionalmente rotulado com uma etiqueta detectável, por exemplo, um isótopo radioativo, e a ligação do anticorpo a células no paciente pode ser avaliada, por exemplo, por varredura externa por radioatividade ou analisando-se uma biópsia obtida de um paciente previamente exposto ao anticorpo.

De forma oposta, um câncer que "não superexpressa ou amplifi-

ca receptor HER" é um que não tem níveis mais alto do que o normal de proteína ou gene receptor HER comparado a uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Os anticorpos que inibem a dimerização de HER, tal como pertuzumabe, podem ser usados para tratar câncer que não superexpressa ou amplifica receptor HER2.

Aqui citado, um "agente antitumor" refere-se a um fármaco usado para tratar câncer. Exemplos não-limitantes de agentes antitumor aqui citados incluem agentes quimioterápicos, inibidores de dimerização de HER, anticorpos contra HER, anticorpos direcionados contra antígenos associados ao tumor, compostos anti-hormonais, citoquinas, fármacos direcionados a EGFR, agentes antiangiogênicos, inibidores de tirosina quinase, agentes inibitórios de crescimento e anticorpos, agentes citotóxicos, anticorpos que induzem apoptose, inibidores COX, inibidores de farnesil transferase, anticorpos que ligam proteína oncofetal CA 125, vacinas contra HER2, inibidores Raf ou ras, doxorubicina lipossômica, topotecana, taxeno, inibidores de tirosina quinase, TLK286, EMD-7200, pertuzumabe, trastuzumabe, erlotinibe, e bevacizumabe.

Um "agente antitumor aprovado" é um fármaco usado para tratar câncer que obedece a aprovação de comercialização por uma autoridade regulatória tal como a Food and Drug Administration (FDA) ou equivalente estrangeiro dessa.

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

Um "agente inibidor de crescimento" quando usado aqui se refere a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente uma célula de câncer expressando HER ou in vitro ou in vivo. Assim, o agente inibidor de crescimento pode ser um que reduz significativamente a porcentagem de células expressando HER na fase S. Exemplos de agentes inibidores de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo de célula (em um local além da fase S), tal como agentes

que induzem interrupção de G1 e interrupção de fase M. Os bloqueadores de fase M clássicos incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxenos, e inibidores de topo II tal como doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposídeo, e bleomicina. Esses agentes que interrompem G1 também sobrefluxo na interrupção de fase S, por exemplo, agentes alquilantes de DNA tal como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracila, e ara-C. Informação adicional pode ser encontrada em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami e outros (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13.

Exemplos de anticorpos "inibidores de crescimento" são aqueles que se ligam a HER2 e inibem o crescimento de células de câncer superexpressando HER2. Os anticorpos contra HER2 inibidores de crescimento preferenciais inibem o crescimento de células tumorais de mama SK-BR-3 em cultura de célula em mais de 20%, e preferencialmente, mais de 50% (por exemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) em uma concentração de anticorpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, onde a inibição de crescimento é determinada seis dias após a exposição das células SK-BR-3 ao anticorpo (vide Patente U.S. Nº 5.677.171 emitida em 14 de Outubro de 1997). O ensaio de inibição de crescimento de célula SK-BR-3 é descrito mais detalhadamente nessa patente e abaixo. O anticorpo inibidor de crescimento preferencial é uma variante humanizada de anticorpo monoclonal de ratos 4D5, por exemplo, trastuzumabe.

Um anticorpo que "induz apoptose" é um que induz morte celular programada como determinado pela ligação de anexina V, fragmentação de DNA, encolhimento de célula, dilatação de retículo endoplásmico, fragmentação celular, e/ou formação de vesículas de membrana (chamados corpos apoptóticos). A célula é usualmente uma que superexpressa o receptor HER2. Preferencialmente, a célula é uma célula tumoral, por exemplo, célula da mama, ovário, estômago, endometrial, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireóide, pancreática, ou da bexiga. In vitro, a célula pode ser uma célula SK-

BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou SKOV3. Vários métodos estão disponíveis para avaliar os eventos celulares associados com apoptose. Por exemplo, a translocação de fosfatidil serina (FS) pode ser medida por ligação com anexina, a fragmentação de DNA pode ser avaliada através de escalonamento de DNA, e condensação nuclear/cromatina junto com fragmentação de DNA pode ser avaliada por qualquer aumento em células hipodiplóides. Preferencialmente, o anticorpo que induz apoptose é um que resulta em aproximadamente 2 a 50 vezes, preferencialmente aproximadamente 5 a 50 vezes, e mais preferencialmente, aproximadamente 10 a 50 vezes a indução de ligação de anexina em relação a célula não tratada em um ensaio de ligação de anexina usando células BT474 (vide abaixo). Exemplos de anticorpos HER2 que induzem apoptose são 7C2 e 7F3.

O "epítopo 2C4" é a região no domínio extracelular de HER2 ao qual o anticorpo 2C4 se liga. De modo a examinar por anticorpos que se ligam essencialmente ao epítopo 2C4, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser executado. Preferencialmente, o anticorpo bloqueia a ligação de 2C4 a HER2 em aproximadamente 50% ou mais. Alternativamente, o mapeamento de epítopo pode ser executado para avaliar se o anticorpo se liga essencialmente ao epítopo 2C4 de HER2. O epítopo 2C4 compreende resíduos do Domínio II (ID SEQ N<sup>o</sup> 15) no domínio extracelular de HER2. 2C4 e pertuzumabe se ligam ao domínio extracelular de HER2 na junção dos domínios I, II e III (ID SEQ N<sup>os</sup> 14, 15 e 16, respectivamente). Franklin e outros, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

O "epítopo 4D5" é a região no domínio extracelular de HER2 ao qual o anticorpo 4D5 (ATCC CRL 10463) e trastazumabe se ligam. Esse epítopo está próximo ao domínio transmembrana de HER2, e dentro do Domínio IV de HER2 (ID SEQ N<sup>o</sup> 17). Para examinar os anticorpos que se ligam essencialmente ao epítopo 4D5, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser executado. Al-

ternativamente, o mapeamento de epítopo pode ser executado para avaliar se o anticorpo se liga essencialmente ao epítopo 4D5 de HER2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região de aproximadamente o resíduo 529 a aproximadamente o resíduo 625, inclusive do HER2 ECD, numeração de resíduo incluindo peptídeo sinal).

O "epítopo 7C2/7F3" é a região no término N, dentro do Domínio I (ID SEQ Nº 14), do domínio extracelular de HER2 ao qual os anticorpos 7C2 e/ou 7F3 (cada um depositado com o ATCC, vide abaixo) se ligam. Para examinar os anticorpos que se ligam essencialmente ao epítopo 7C2/7F3, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser executado. Alternativamente, o mapeamento de epítopo pode ser executado para estabelecer se o anticorpo se liga essencialmente ao epítopo 7C2/7F3 em HER2 (por exemplo, quaisquer um ou mais dos resíduos na região de aproximadamente o resíduo 22 a aproximadamente o resíduo 53 do HER2 ECD, numeração de resíduo incluindo peptídeo sinal).

"Tratamento" refere-se a ambos o tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com câncer bem como aqueles nos quais o câncer é prevenido. Portanto, o paciente a ser tratado aqui pode ter sido diagnosticado como tendo câncer ou pode ser predisposto ou suscetível a câncer.

O termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar câncer no paciente. A quantidade eficaz do fármaco pode reduzir o número de células de câncer, reduzir o tamanho do tumor, inibir (isto é, retardar em alguma extensão e preferencialmente parar) a infiltração de célula de câncer em órgãos periféricos, inibir (isto é, retardar em alguma extensão e preferencialmente parar) metástase do tumor, inibir, em alguma extensão, o crescimento do tumor, e/ou aliviar em alguma extensão um ou mais dos sintomas associados com o câncer. No caso do fármaco poder prevenir o crescimento e/ou matar células de câncer existentes, ele pode ser citostático e/ou citotóxico. A quantidade eficaz que pode estender a

sobrevida livre de progressão (por exemplo, medida por Critérios de Avaliação de resposta para Tumores Sólidos, RECIST, ou mudanças CA-125), resulta em uma resposta objetiva (incluindo uma resposta parcial, RP, ou resposta completa, RC), aumenta o tempo de sobrevida global, e/ou melhora um ou mais sintomas de câncer (por exemplo, como avaliado por FOSI).

O termo "agente citotóxico" como usado aqui se refere a uma substância que inibe ou impede o funcionamento de células e/ou causa a destruição delas. O termo pretende incluir isótopos radiativos (por exemplo,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, e toxinas tais como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, de planta ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes dessas.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclossofamida CYTOXAN®, alquil sulfonatos tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; a camptotecina (incluindo o topotecana análoga sintética (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecana, CAMPTOSAR®, acetilcamptotecina, escoplectina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina), podofilotoxina, ácido podofilínico, teniposida, criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8), dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1), eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongistatina, mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalana, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila, nitrosuréias tais como carmustina, clorozotocina, fote-

mustina, lomustina, nimustina, e ranimustina, bisfosfonatos, tais como clodronato; antibióticos tais como os antibióticos de enedina (*por exemplo*, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 e calicheamicina omegal1 (vide, por exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)) e

5 antraciclinas tais como anamicina, AD 32, aclarubicina, daunorubicina, dexrazoxana, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogarila, dinemicina, incluindo dinemicina A, uma esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos de antibiótico de enedina de cromoproteína

10 relacionada, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA® doxorubicina (incluindo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina lipossômica, e desoxidoxorubicina),

15 esorubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido mico-fenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, e zorubicina, análogos de ácido fólico tais como denopte-rina, pteroptera, e trimetrexato, análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, e tioguanina, análogos de pirimidina tais como

20 ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, e floxuridina, andrógenos tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestana, e testolactona, antiadrenais tais como aminoglutetimida, mitotana, e trilostana, reabastece-dor de ácido fólico tal como ácido folínico (leucovorina), aceglatona, agentes

25 antineoplásicos antifolate tais como ALIMTA®, pemetrexed LY231514, inibi-dores de diidrofolato redutase tais como metotrexato, antimetabólitos tais como 5-fluorouracila (5-FU) e seus pró-fármacos tais como UFT, S-1 e ca-pecitabina, e inibidores de timidilato sintase e inibidores de glicinamida ribo-nucleotídeo formiltransferase tais como raltitrexed (TOMUDEX<sup>RM</sup>, TDX), inibi-

30 dores de diidropirimidina desidrogenase tais como eniluracila, aldofosfami-da glicosídeo; ácido aminolevulínico, amsacrina, bestrabucila, bisantrena, edatraxato, defofamina, demecolcina, diaziquna, elfornitina, acetato de elip-

tíniio, uma epotilona, etoglucida, nitrato de gálio, hidroxiuréia, lentinana, lonidainina, maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, 2-etilidrazida, procarbazona, complex polissacarídeo PSK7  
5 (JHS Natural Products, Eugene, OR), razoxana, rizoxina, sizofirana, espirogermânio, ácido tenuazônico, triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina, tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina), uretana, vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromana, gacitosina, arabinosida ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, taxóides e taxenos, por exemplo, paclitaxel TAXOL®  
10 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ livre de Cremofor, formação de nanopartículas elaboradas com albumina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França), cloranbucila, gencitabina (GEMZAR®), 6-tioguanina, mercaptopurina, platina, análogos de platina ou análogos à base de platina tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina, vinblastina (VELBAN®), etoposida (VH-16), ifosfamida, mitoxantona, vincristina (ONCOVIN®), vinca alcalóide, vinorelbina (NAVELBINE®), novantrona, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato,  
20 inibidor de topoisomerase RFS 2000, difluormetilornitina (DMFO), retinóides tal como ácido retinóico, sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de quaisquer dos acima, bem como combinações de dois ou mais dos acima tal como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™)  
25 combinado com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nesta definição estão agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação do hormônio em tumores tais como antiestrogênicos e moduladores de receptor de estrogênio seletivos (SERMs),  
30 incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno FARESTON®, inibidores de aromatase

que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrogênio nas glândulas adrenais, tal como, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, e anastrozol ARIMIDEX®, e antiandrógenos tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina, bem como troxacitabina (um análogo de citosina 1,3-dioxolano nucleosídeo), oligonucleotídeos anti-senso, particularmente aqueles que exibem expressão de genes em rotas de sinalização implicadas em proliferação de célula anormal, tal como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R), vacinas tais como vacinas de terapia, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, e VAXID®, rIL-2PROLEUKIN®, inibidor de topoisomerase 1 LURTOTECAN®, rmRH ABA-RELIX®, e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de quaisquer dos acima.

Um "agente quimioterápico antimetabólito" é um agente que é estruturalmente similar a um metabólito, mas não pode ser usado pelo corpo de uma maneira produtiva. Muitos agentes quimioterápicos antimetabólito interferem na produção dos ácidos nucleicos, RNA e DNA. Exemplos de agentes quimioterápicos antimetabólito incluem gencitabina (GEMZAR®), 5-fluorouracila (5-FU), capecitabina (XELODA™), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina citarabina ARA-C (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, deoxicitosina, piridmideno, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-desóxi-D-glicose, etc. O agente quimioterápico antimetabólito é gencitabina.

A "gencitabina" ou "2'-desóxi-2', 2'-difluorcitidina monoidrocloreto (b-isômero)" é um análogo de nucleosídeo que exibe atividade antitumor. A fórmula empírica para HCl de gencitabina é C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> A HCl. O HCl de gencitabina é vendido por Eli Lilly sob a marca GEMZAR®.

Um "agente quimioterápico à base de platina" compreende um composto orgânico que contém platina como uma parte integrada da molécula. Exemplos de agentes quimioterápicos à base de platina incluem carboplatina, cisplatina, e oxaliplatina.

Por "quimioterapia à base de platina" entende-se terapia com um ou mais agentes quimioterápicos à base de platina, opcionalmente em combinação com um ou mais outros agentes quimioterápicos.

5 Por câncer "resistente à quimioterapia" entende-se que o paciente com câncer progrediu enquanto recebendo um regime de quimioterapia (isto é, o paciente é "refratário à quimioterapia"), ou o paciente progrediu em 12 meses (por exemplo, em 6 meses) depois de completar um regime de quimioterapia.

10 Por câncer "resistente à platina" entende-se que o paciente com câncer progrediu enquanto recebendo quimioterapia à base de platina (isto é, o paciente é "refratário à platina"), ou o paciente progrediu em 12 meses (por exemplo, em 6 meses) depois de completar um regime de quimioterapia à base de platina.

15 Um "agente antiangiogênico" refere-se a um composto que bloqueia, ou interfere em algum grau no desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator antiangiogênico pode, por exemplo, ser uma pequena molécula ou anticorpo que se liga a um fator de crescimento ou receptor de fator de crescimento envolvido em promover angiogênese. O fator antiangiogênico preferencial aqui citado é um anticorpo que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumabe (AVASTIN®).

20 O termo "citoquina" é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que age em outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citoquinas são linfoquinas, monoquinas e hormônios de polipeptídeo tradicionais. Incluídos entre as citoquinas estão  
25 o hormônio de crescimento tal como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionila, e hormônio de crescimento bovino, hormônio paratiróide, tirozina, insulina, pró-insulina, relaxina, pró-relaxina, hormônios de glicoproteína tais como hormônio estimulante de folículo (FSH), hormônio estimulante de tiróide (TSH), e hormônio de luteinização  
30 ção (LH), fator de crescimento hepático, fator de crescimento de fibroblasto, prolactina, lactógeno placentário, fator  $\alpha$  e  $\beta$  de necrose de tumor, substância de inibição muleriana, peptídeo associado com gonadotropina de ratos,

inibina, activina, fator de crescimento endotelial vascular, integrina, trombo-  
poietina (TPO), fatores de crescimento de nervos tal como NGF- $\beta$ , fator de  
crescimento de plaquetas, fatores de crescimento transformantes (TGFs)  
tais como TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , fator-I e fator-II de crescimento similar à insulina,  
5 eritropoietina (EPO), fatores osteoindutivos, interferonas tais como interfe-  
ro-na- $\alpha$ , - $\beta$ , e - $\gamma$ , fatores estimuladores de colônia (CSFs) tais como CSF de  
macrófagos (M-CSF), CSF de macrófagos granulócitos (GM-CSG), e CSF de  
granulócitos (G-CSF), interleuquinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-  
4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, um fator de necrose de tumor  
10 tal como TNF- $\alpha$  ou TNF- $\beta$ , e outros fatores de polipeptídeos incluindo LIF e  
kit ligante (KL). Como usado aqui, o termo citocina inclui proteínas de fon-  
tes naturais ou de cultura de célula recombinante e equivalentes biológica-  
mente ativos das citocinas de sequência nativa.

Como usado aqui, o termo "fármaco direcionado a EGFR" refe-  
15 re-se a um agente terapêutico que se liga a EGFR e, opcionalmente, inibe a  
ativação de EGFR. Exemplos de tais agentes incluem anticorpos e peque-  
nas moléculas que se ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos que se ligam a  
EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL  
HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (vide,  
20 Patente US N<sup>o</sup> 4.943.533, Mendelsohn *e outros*) e variantes desses, tal co-  
mo 225 quimerizado (C225 ou Cetuximabe; ERBUTIX<sup>®</sup>) e human 225 hu-  
mano redimensionado (H225) (vide, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.);  
IMC-11F8, um anticorpo direcionado a EGFR completamente humano (Im-  
clone), anticorpos que se ligam a EGFR mutante tipo II (Patente US N<sup>o</sup>  
25 5.212.290), anticorpos quiméricos e humanizados que se ligam a EGFR co-  
mo descrito na Patente US N<sup>o</sup> 5.891.996, e anticorpos humanos que se li-  
gam a EGFR, tal como ABX-EGF (vide WO 98/50433, Abgenix); EMD 55900  
(Stragliotto *e outros*, *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matu-  
zumabe) um anticorpo EGFR humanizado direcionado contra EGFR que  
30 compete com ambos EGF e TGF-alfa para ligação com EGFR, e mAb 806  
ou mAb 806 humanizado (Johns *e outros*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-  
30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com um agente

citotóxico, assim gerando um imunocombinado (vide, por exemplo, EP 659.439A2, Merck Patent GmbH). Exemplos de pequenas moléculas que se ligam a EGFR incluem ZD1839 ou Gefitinibe (IRESSA; Astra Zeneca), CP-358774 ou Erlotinibe (TARCEVA™; Genentech/OSI), e AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), EMD-7200.

Um "inibidor de tirosina quinase" é uma molécula que inibe a atividade de uma tirosina quinase tal como um receptor HER. Exemplos de tais inibidores incluem os fármacos direcionados a EGFR observados no parágrafo anterior, inibidor de tirosina quinase HER2 de pequena molécula tal como TAK165 disponível a partir de Takeda, CP-724.714, um inibidor seletivo oral do receptor de tirosina quinase ErbB2 (Pfizer e OSI), inibidores de HER duplos tal como EKB-569 (disponível a partir de Wyeth) que preferencialmente se liga a EGFR, mas inibe ambas as células superexpressando HER2 e EGFR, GW572016 (disponível a partir da Glaxo) um inibidor de tirosina quinase HER2 e EGFR oral, PKI-166 (disponível a partir da Novartis), inibidores pan-HER tal como canertinibe (CI-1033; Pharmacia), inibidores de Raf-1 tal como agente antissenso ISIS-5132 disponível a partir de ISIS Pharmaceuticals que inibe sinalização de Raf-1, inibidores TK direcionados a não HER tal como mesilato de Imatinibe (Gleevac™) disponível a partir da Glaxo, inibidor de quinase I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponível a partir de Pharmacia), quinazolininas, tal como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolinina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706, pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas, curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoranilino)ftalimida), tirfostinas contendo porções de nitrotiofeno, PD-0183805 (Warner-Lambert), moléculas antissenso (por exemplo, aquelas que se ligam a ácido nucléico codificando HER), quinoxalinas (Patente US Nº 5.804.396), tirfostinas (Patente US Nº 5.804.396), ZD6474 (Astra Zeneca), PTK-787 (Novartis/Schering AG), inibidores pan-HER tal como CI-1033 (Pfizer), Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly), mesilato de Imatinibe (Gleevac; Novartis), PKI 166 (Novartis), GW2016 (Glaxo SmithKline), CI-1033 (Pfizer), EKB-569 (Wyeth), Semaxinibe (Sugen), ZD6474 (AstraZeneca), PTK-787 (Novar-

tis/Schering AG), INC-1C11 (Imclone), ou como descrito em qualquer das seguintes publicações de patente: Patente US Nº 5.804.396, WO 99/09016 (American Cyanamid), WO 98/43960 (American Cyanamid), WO 97/38983 (Warner Lambert), WO 99/06378 (Warner Lambert), WO 99/06396 (Warner Lambert), WO 96/30347 (Pfizer, Inc), WO 96/33978 (Zeneca), WO 96/3397 (Zeneca), e WO 96/33980 (Zeneca).

Uma dose "fixa" ou "estável" de um agente terapêutico aqui citado se refere a uma dose que é administrada a um paciente humano sem considerar o peso (WT) ou área de superfície corporal (BSA) do paciente. A dose fixa ou estável é, portanto, não fornecida como uma dose MG/kg ou uma dose MG/m<sup>2</sup>, mas de preferência como uma quantidade absoluta do agente terapêutico.

Uma dose "de carga" aqui citada geralmente compreende uma dose inicial de um agente terapêutico administrada a um paciente, e é seguida por uma ou mais doses de manutenção desse agente. Geralmente, uma única dose de carga é administrada, mas múltiplas doses iniciais são observadas aqui. Usualmente, a quantidade de dose de carga administrada excede a quantidade da dose(s) de manutenção administrada e/ou as doses iniciais são administradas mais frequentemente do que a dose(s) de manutenção, tal como para alcançar a concentração em regime permanente desejada do agente terapêutico antes do que pode ser alcançado com a dose(s) de manutenção.

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

## II. Produção de Anticorpos

O antígeno de HER a ser usado para a produção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do domínio extracelular de um receptor HER ou uma parte desse, contendo o epítipo desejado. Alternati-

vamente, as células expressando HER em sua superfície de célula (por exemplo, células NIH-3T3 transformadas para superexpressar HER2, ou uma linha celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, vide Stancovski e outros, *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) pode ser usada para gerar anticorpos. Outras formas de receptor HER úteis para gerar anticorpos estarão aparentes aos versados na técnica.

(i) Anticorpos Policlonais

Os anticorpos policlonais são preferencialmente elevados em animais por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e de um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante para uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina do molusco *heyhole limpet*, albumina de soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina da soja usando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , ou  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , onde R e  $\text{R}^1$  são diferentes grupos alquila.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados combinando-se, por exemplo, 100  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando-se a solução de forma intradérmica em múltiplos sítios. Um mês depois, os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a 14 dias depois, os animais são sangrados e o soro é ensaiado por concentração de anticorpo. Os animais são reforçados até a paralisação da concentração. Preferencialmente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado para uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Os conjugados podem também ser feitos em culturas de células recombinantes como fusões de proteínas. Também, os agentes de agregação tal como alume são adequadamente usados para intensificar a resposta imune.

(ii) Anticorpos Monoclonais

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

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

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

As células de mieloma preferenciais são aquelas que se fundem eficazmente, suportam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células que produzem anticorpos selecionados, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Dentre essas, as linhagens celulares de mieloma preferenciais são linhagens de mieloma de ratos, tal como aquelas derivadas de tumores em ratos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis a partir de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia USA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis a partir de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA. As linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma rato-humano também foram descritas para a produção de anticorpos

monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); e Brodeur e outros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

5 O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão crescendo é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade da ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzimas (ELISA).

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

15 Depois que as células de hibridoma são identificadas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados limitando os procedimentos de diluição e cultivados por métodos padrões (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para esse propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Em adição, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como  
20 tumores de ascite em um animal.

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

O DNA codificando os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando provas de oligonucleotídeo que são capazes de ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesada e leve de anticorpos de ratos). As  
30 células de hibridoma servem como uma fonte preferencial de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser localizado em vetores de expressão, que são então transfectados em células de hospedeiro como células *E. coli*, células

COS de macacos, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem, de outra forma, proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão de expressão recombinante em bactérias de DNA codificando o anticorpo incluem Skerra *e outros*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

Em uma modalidade adicional, os anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados das bibliotecas de anticorpos expressas em fagos geradas usando as técnicas descritas em McCafferty *e outros*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *e outros*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *e outros*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos de ratos e de seres humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Subsequentes publicações descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa nM) por mistura de cadeia (Marks *e outros*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatorial e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *e outros*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Assim, essas técnicas são alternativas viáveis a técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos monoclonais.

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

Tipicamente tais polipeptídeos não-imunoglobulina são substituídos para os domínios constantes de um anticorpo, ou eles são substituídos para os domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade para um antígeno e

outro sítio de combinação de antígeno tendo especificidade para um antígeno diferente.

(iii) Anticorpos Humanizados

Os métodos para humanizar anticorpos não-humanos foram descritos na técnica. Preferencialmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos nele a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácido não-humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados" que são tipicamente obtidos de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente executada seguindo o método de Winter e co-trabalhadores (Jones e outros, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen e outros, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), substituindo sequências de região hipervariável para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. Nº 4.816.567) sendo que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de região hipervariável e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, ambos leve e pesado, para ser usada em obter os anticorpos humanizados é muito importante para reduzir antigenicidade. De acordo com o então chamado método "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é examinada contra a biblioteca inteira de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que está mais próxima daquela do roedor é então aceita como a região de estrutura humana (RE) para o anticorpo humanizado (Sims e outros, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia e outros, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Outro método usa uma região de estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes

(Carter e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta e outros, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com a retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar esse objetivo, de acordo com um método preferencial, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares aos versados na técnica. Os programas de computador estão disponíveis, os quais ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidata. A inspeção dessas exibições permite a análise da função provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influencia a capacidade da imunoglobulina candidata para ligar a seu antígeno. Dessa forma, os resíduos de RE podem ser selecionados e combinados a partir do recipiente e importam sequências tal que a característica de anticorpo desejada, tal como a afinidade aumentada para o antígeno(s) alvo é alcançada. Em geral, os resíduos de região hipervariável são diretamente e mais substancialmente envolvidos em influenciar ligação com antígeno.

A Patente U.S. Nº 6.949.245 descreve a produção de anticorpos HER2 humanizados exemplificados que se ligam a HER2 e bloqueiam a ativação de ligante de um receptor HER. O anticorpo humanizado usado nos métodos da presente invenção é rhuMAb 2C4 (pertuzumabe), ou um anticorpo que se liga essencialmente ao mesmo epítipo do domínio extracelular de HER2 como pertuzumabe. Em outras modalidades, um dos anticorpos usados nos métodos da presente invenção bloqueia ativação mediada por EGF, TGF- $\alpha$  e/ou HRG de MAPK essencialmente eficazmente como anticorpo monoclonal de ratos 2C4 (ou um fragmento Fab desse) e/ou se liga a HER2 essencialmente como eficazmente como anticorpo monoclonal de ratos 2C4 (ou um fragmento Fab desse). O anticorpo humanizado aqui citado

pode, por exemplo, compreender resíduos de região hipervariável não-humano incorporados em um domínio pesado variável humano e pode adicionalmente compreender uma substituição de região de estrutura (RE) em uma posição selecionada a partir do grupo que consiste em 69H, 71H e 73H utilizando o sistema de numeração de domínio variável apresentado em Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Em uma modalidade, o anticorpo humanizado compreende substituições de RE em duas ou todas as posições 69H, 71H e 73H.

Um anticorpo humanizado exemplificado de interesse aqui citado compreende resíduos de determinação de complementaridade de domínio pesado variável GFTFTDYTMX (ID SEQ N<sup>o</sup> 18), onde X é preferencialmente D ou S, DVNPNSGGSIYNQRFKG (ID SEQ N<sup>o</sup> 19), e/ou NLGPSFYFDY (ID SEQ N<sup>o</sup> 20), opcionalmente compreendendo modificações de aminoácido daqueles resíduos de CDR, por exemplo, onde as modificações essencialmente mantêm ou aperfeiçoam a afinidade do anticorpo. Por exemplo, uma variante de anticorpo para uso nos métodos da presente invenção pode ter de aproximadamente um a aproximadamente sete ou aproximadamente cinco substituições de aminoácido nas sequências de CDR pesada variáveis. Tais variantes de anticorpo podem ser preparadas por maturação de afinidade, por exemplo, como descrito abaixo.

O anticorpo humanizado pode compreender resíduos de determinação de complementaridade de domínio leve variável KASQDVSIGVA (ID SEQ N<sup>o</sup> 21), SASYX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>, onde X<sup>1</sup> é preferencialmente R ou L, X<sup>2</sup> é preferencialmente Y ou E, e X<sup>3</sup> é preferencialmente T ou S (ID SEQ N<sup>o</sup> 22); e/ou QQYYIYPYT (ID SEQ N<sup>o</sup> 23), por exemplo, em adição àqueles resíduos CDR de domínio pesado variável no parágrafo anterior. Tais anticorpos humanizados opcionalmente compreendem modificações de aminoácido dos resíduos de CDR acima, por exemplo, onde as modificações essencialmente mantêm ou aperfeiçoam a afinidade do anticorpo. Por exemplo, a variante de anticorpo de interesse pode ter de aproximadamente um a aproximadamente sete ou aproximadamente cinco substituições de aminoácidos nas sequên-

cias de CDR leves variáveis. Tais variantes de anticorpos podem ser preparadas por maturação de afinidade, por exemplo, como descrito abaixo.

O presente pedido de patente também observa os anticorpos de afinidade madura que se ligam a HER2. O anticorpo pai pode ser um anti-  
5 corpo humano ou um anticorpo humanizado, por exemplo, um compreendendo as sequências de cadeia leve variável e/ou de cadeia pesada variável de ID SEQ N<sup>os</sup> 7 e 8, respectivamente (isto é, compreendendo o V<sub>L</sub> e/ou V<sub>H</sub> de pertuzumabe). Uma variante de afinidade madura de pertuzumabe preferencialmente se liga ao receptor HER2 com uma afinidade superior àquela  
10 de ratos 2C4 ou pertuzumabe (por exemplo, afinidade aperfeiçoada aproximadamente duas ou aproximadamente quatro vezes, a aproximadamente 100 vezes ou aproximadamente 1000 vezes, por exemplo, como avaliado usando um domínio extracelular de HER2 (ECD) ELISA). Os resíduos de CDR pesada variáveis exemplificados para substituição incluem H28, H30,  
15 H34, H35, H64, H96, H99, ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, ou sete desses resíduos). Exemplos de resíduos de CDR leve variáveis para alteração incluem L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 ou combinações de dois ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, ou mais até aproximadamente dez desses resíduos).

20 A humanização de anticorpo 4D5 de ratos para gerar variantes humanizadas desse, incluindo trastuzumabe, é descrita na Patente U.S. N<sup>os</sup> 5.821.337, 6.054.297, 6.407.213, 6.639.055, 6.719.971, e 6.800.738, bem como Carter e outros, PNAS (USA), 89:4285-4289 (1992). HuMAb4D5-8 (trastuzumabe) limita o antígeno de HER2 3 vezes mais firmemente do que o  
25 anticorpo 4D5 de ratos, e tinha função imune secundária (ADCC) que permitiu atividade citotóxica direcionada do anticorpo humanizado na presença de células efectoras humanas. HuMAb4D5-8 compreendeu resíduos CDR leve (V<sub>L</sub>) variáveis incorporados em uma estrutura de consenso de subgrupo I V<sub>L</sub>, e os resíduos de CDR pesada (V<sub>H</sub>) variáveis incorporados em uma estrutura  
30 de consenso de subgrupo III V<sub>H</sub>. O anticorpo adicionalmente compreendeu substituições de região de estrutura (RE) como posições: 71, 73, 78, e 93 do V<sub>H</sub> (numeração de Kabat de resíduos de RE, e uma substituição de RE na

posição 66 do V<sub>L</sub> (numeração de Kabat de resíduos de RE). Trastuzumabe compreende região Fc 1  $\gamma$  humana de alótipo não -A.

Várias formas do anticorpo humanizado ou anticorpo de afinidade madura são observadas. Por exemplo, o anticorpo humanizado ou anticorpo de afinidade madura pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um Fab, que é opcionalmente conjugado com um ou mais agentes citotóxicos de modo a gerar um imunocjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado ou anticorpo de afinidade madura pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo IgG1 intacto.

#### 10 (iv) Anticorpos Humanos

Como uma alternativa à humanização, os anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, ratos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que o apagamento de homozigoto do gene de região de união de cadeia pesada de anticorpo (J<sub>H</sub>) em ratos mutantes de linha genética e quimérica resulta em inibição completa de produção de anticorpo endógeno. A transferência do arranjo de gene de imunoglobulina de linha genética humana em tais ratos mutantes de linha genética resultará na produção de anticorpos humanos mediante o desafio de antígeno. Vide, por exemplo, Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann e outros, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); e Patente U.S. N<sup>os</sup> 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807. Alternativamente, a tecnologia de exibição de fagos (McCafferty e outros, *Nature* 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos in vitro, a partir de repertórios de gene de domínio variável (V) de doadores não imunizados. De acordo com essa técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados no quadro ou no gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e exibido como fragmentos de anticorpo funcional na superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentososa contém uma cópia de DNA de filamento único do ge-

noma do fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam em seleção do gene codificando o anticorpo exibindo essas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser executada em uma variedade de formatos, para sua revisão vide, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de gene V podem ser usadas para exibição de fago. Clackson e outros, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolaram um arranjo diverso de anticorpos antioxazolona de uma biblioteca combinatorial aleatória pequena de genes V derivados dos baços de ratos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não-imunizados pode ser construído e anticorpos para um arranjo diverso de antígenos (incluindo autoantígenos) podem ser isolados essencialmente seguindo as técnicas descritas por Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith e outros, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Vide, também, Patente U.S. Nºs 5.565.332 e 5.573.905.

Como discutido acima, os anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas in vitro (vide Patentes U.S. 5.567.610 e 5.229.275).

Os anticorpos contra HER2 humanos são descritos na Patente U.S. Nº 5.772.997 emitida em 30 de Junho de 1998 e WO 97/00271 publicada em 3 de Janeiro de 1997.

#### (v) Fragmentos de Anticorpo

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos compreendendo uma ou mais regiões de ligação a antígeno. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto e outros, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992), e Brennan e outros, *Science*, 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células de hospedeiro recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados das bibliotecas de anticorpos expressas em fagos discutido acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimi-

camente acoplados para formar fragmentos  $F(ab')_2$  (Carter e outros, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos  $F(ab')_2$  podem ser isolados diretamente de cultura celular de hospedeiro recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo estarão aparentes aos versados na técnica. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de única cadeia (scFv). Vide WO 93/16185, Patente U.S. Nº 5.571.894, e Patente U.S. Nº 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na Patente U.S. 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpo linear podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação para ao menos dois epítopos diferentes. Os anticorpos biespecíficos exemplificados podem se ligar a dois epítopos diferentes da proteína HER2. Outros tais anticorpos podem combinar um sítio de ligação a HER2 com o sítio(s) de ligação para EGFR, HER3 e/ou HER4. Alternativamente, um braço de HER2 pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula de disparo em um leucócito tal como a molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) tal como para focar mecanismos de defesa celular à célula de expressão de HER2. Os anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos para células que expressam HER2. Esses anticorpos possuem um braço de ligação a HER2 e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, anti-interferona- $\alpha$ , vinca alcalóide, cadeia de ricina A, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

WO 96/16673 descreve um anticorpo biespecífico HER2/FcγRIII e a Patente U.S. Nº 5.837.234 descreve um IDM1 de anticorpo biespecífico HER2/FcγRI (Osidem). Um anticorpo biespecífico HER2/Fc $\alpha$  é mostrado em WO 98/02463. A Patente U.S. Nº 5.821.337 apresenta um anticorpo biespe-

cífico HER2/CD3. MDX-210 é um Ab biespecífico HER2-FcγRIII.

Métodos para obter anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento completo é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm diferentes especificidades (Millstein e outros, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Por causa da variedade aleatória de cadeias leves e pesadas de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 diferentes moléculas de anticorpos, das quais somente uma tem a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é usualmente feita por etapas de cromatografia de afinidade, é de preferência complicada, e os rendimentos do produto são baixos. Procedimentos similares são descritos em WO 93/08829, e em Traunecker e outros, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, os domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação anticorpo-antígeno) são fundidos em sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão preferencialmente é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo ao menos parte da articulação, regiões CH2, e CH3. É preferencial ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve, presente em ao menos uma das fusões. Os DNAs codificando as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isso fornece grande flexibilidade em ajustar as proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeo em modalidades quando relações desiguais das três cadeias de polipeptídeo usadas na construção fornecem os rendimentos otimizados. É, entretanto, possível inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeo em um vetor de expressão quando a expressão de ao menos duas cadeias de polipeptídeos em relações iguais resulta em altos rendimentos ou quando as relações não são de significância particular.

Em uma modalidade preferencial dessa abordagem, os anticor-

pos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (fornecendo uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa

5 estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, à medida que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em somente uma metade da molécula biespecífica fornece uma maneira fácil de separação. Essa abordagem é descrita em WO 94/04690. Para detalhes adicionais de gerar

10 anticorpos biespecíficos, vide, por exemplo, Suresh e outros, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente U.S. Nº 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser elaborada para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de célula recombinante. A interface preferencial compreende ao menos uma parte do domínio C<sub>H</sub>3 de um domínio constante de anti-

15 corpo. Nesse método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácidos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à grande cadeia(s) lateral

20 são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo as grandes cadeias laterais de aminoácido com menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso fornece um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou

25 "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro à botina. Tais anticorpos foram, por exemplo, propostos para focar células de sistema imune a células indesejadas (Patente U.S. Nº 4.676.980), e para tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser obtidos usando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Os

30 agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são descri-

tos na Patente U.S. Nº 4.676.980, junto com inúmeras técnicas de reticulação.

Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram também descritas na literatura. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan e outros, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento onde anticorpos intactos são clivados de forma proteolítica para gerar fragmentos  $F(ab')_2$ . Esses fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e impedir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos  $Fab'$  gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados  $Fab'$ -TNB é então re-convertido no  $Fab'$ -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado  $Fab'$ -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

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

Várias técnicas de obter e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente de cultura de células recombinantes foram também descritas. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos foram produzidos usando zíperes de leucina. Kostelny e outros, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina a partir de proteínas Fos e Jun foram ligados às partes  $Fab'$  de dois anticorpos diferentes por fusão de gene. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e então reoxidados para formar os heterodímeros de anti-

corpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para obter fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) conectado a domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) por um ligador que é muito curto para permitir emparelhamento entre dois domínios na mesma cadeia. Consequentemente, os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios  $V_H$  e  $V_L$  complementares de outro fragmento, desse modo formando dois sítios de ligação com antígeno. Outra estratégia para obter fragmentos de anticorpo biespecífico pelo uso de dímeros Fv de cadeia única (sFv) foi também relatada. Vide See Gruber e outros, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Os anticorpos com mais de duas valências são observados. Por exemplo, os anticorpos trispecíficos podem ser preparados. Tutt e outros, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Outras modificações na sequência de aminoácidos

As modificações na sequência de aminoácido dos anticorpos descritas aqui são observadas. Por exemplo, pode ser desejável aperfeiçoar a afinidade de ligação e/ou propriedades biológicas do anticorpo. As variantes de sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas introduzindo-se mudanças de nucleotídeo apropriadas no ácido nucléico do anticorpo, ou por síntese de peptídeo. Tais modificações incluem, por exemplo, apagamentos, e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de apagamento, inserção e substituição é feita para chegar na construção final, já que esta possui as características desejadas. As mudanças de aminoácidos também podem alterar processos pós-translacionais do anticorpo, tal como mudar o número ou posição de sítios de glicosilação.

Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferenciais para mutagênese é chamado "mutagênese de varredura de alanina" como descrito por Cunningham e

Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (por exemplo, resíduos carregados tal como arg, asp, his, Lys, e glu) e substituídos por um aminoácido negativamente carregado (mais preferencialmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Essas localizações de aminoácidos demonstrando sensibilidade funcional às substituições então são refinadas introduzindo-se outras variantes nos sítios de substituição ou para eles. Assim, enquanto o sítio para introduzir uma variação de sequência de aminoácido é predeterminado, a natureza da mutação, por si mesma, não necessita ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, a mutagênese de varredura de alanina ou mutagênese aleatória é conduzida ao códon ou região alvo e as variantes de anticorpos expressas são examinadas para a atividade desejada.

As inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões de terminal amino e/ou carboxila na faixa de comprimento de um resíduo a polipeptídeos contendo centenas de resíduos ou mais, bem como inserções intrassequência de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções de terminais incluem anticorpo com resíduo metionila em terminal N ou o anticorpo fundido em um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes insercionais da molécula de anticorpo incluem a fusão no terminal N ou C do anticorpo a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida do soro do anticorpo.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácido. Essas variantes têm ao menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese substitucional incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações de RE são também observadas. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o título de "substituições preferenciais". Se tais substituições resultam em uma mudança na atividade biológica, então mais mudanças substanciais, denominadas "substituições exemplificadas" na Tabela 1, ou como adicionalmente descrito abaixo em relação a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos examinados.

Tabela 1

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

As modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são executadas selecionando-se substituições que diferem significativamente em seu efeito de manter (a) a estrutura da cadeia principal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em lâmina ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com similaridades nas propriedades de suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publi-

shers, New York (1975)):

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

(2) polar não carregada: Gly (G), Ser (S), Tr (T), Cys (C), Tir (Y),  
5 Asn (N), Gln (Q)

(3) ácida: Asp (D), Glu (E)

(4) básica: Lys (K), Arg (R), His(H).

Alternativamente, os resíduos naturalmente ocorrendo podem ser divididos em grupos baseados em propriedades comuns de cadeia lateral:

10 (1) Hidrofóbica: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

(2) hidrofílica neutra: Cys, Ser, Tr, Asn, Gln,

(3) ácida: Asp, Glu,

(4) básica: His, Lys, Arg,

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

15 (6) aromática: Trp, Tir, Phe.

As substituições não-conservativas exigirão trocar um membro de uma dessas classes para outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido em manter a conformação apropriada do anticorpo pode também ser substituído, geralmente com serina, para aperfeiçoar a estabilidade oxidativa da molécula e impedir reticulação aberrante. De forma oposta, as ligações de cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Um tipo particularmente preferencial de variante substitucional envolve substituir um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo pai (por exemplo, um anticorpo humano ou humanizado). Geralmente, a variante(s) resultante selecionada para desenvolvimento adicional terá propriedades biológicas aperfeiçoadas em relação ao anticorpo pai a partir do qual elas são geradas. Uma forma conveniente para gerar tais variantes substitucionais envolve maturação de afinidade usando exibição de fago. Brevemente, os vários sítios da região hipervariável (por exemplo, sítios 6-7) são mudados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis

em cada sítio. As variantes de anticorpo assim geradas são exibidas em um modelo monovalente de partículas de fagos filamentosos como fusões ao produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes exibidas em fagos são então examinadas para sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) como aqui descrita. De modo a identificar os sítios da região hipervariável candidatos para modificação, a mutagênese de varredura de alanina pode ser executada para identificar resíduos de região hipervariável contribuindo significativamente para ligação com antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura em cristal do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e HER2 humana. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas aqui. Uma vez que tais variantes sejam geradas, o painel de variantes é submetido a exame como descrito aqui e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alteração entende-se apagar uma ou mais porções de carboidrato encontradas no anticorpo, e/ou adicionar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ou ligada a N ou ligada a O. Por ligada a N, entende-se a ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Por glicosilação ligada a O entende-se a ligação de um dos açúcares N-aceilgalactosamina, galactose, or xilose a um ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam também ser usados.

A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é conveniente-

mente executada alterando-se a sequência de aminoácido tal que ela conte-  
nha uma ou mais das sequências de tripeptídeo descritas acima (para sítios  
de glicosilação ligados a N). A alteração pode também ser feita pela adição  
ou substituição por um ou mais resíduos de serina ou treonina à equência do  
5 anticorpo original (para sítios de glicosilação ligados a O).

Quando o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato  
ligado a essa pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com uma estrutura  
de carboidrato madura que carece de frutose ligada a uma região Fc do anti-  
corpo são descritos no Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0157108 A1, Presta,  
10 L. Vide também US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Os  
anticorpos com um N-acetilglicosamina (GlcNAc) bissecionado no carboidra-  
to ligado a uma região Fc do anticorpo são referidos em WO 03/011878, Je-  
an-Mairet e outros, e Patente U.S. Nº 6.602.684, Umana e outros. Os anti-  
corpos com ao menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado a  
15 uma região Fc do anticorpo são relatados em WO 97/30087, Patel e outros.  
Vide também WO 98/58964 (Raju, S.) e WO 99/22764 (Raju, S.) conside-  
rando anticorpos com carboidrato alterado ligado à região Fc desse.

Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com rela-  
ção à função efetora, por exemplo, tal como para intensificar a citotoxicidade  
20 mediada por célula dependente de antígeno (ADCC) e/ou complementar ci-  
totoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isso pode ser  
alcançado introduzindo-se uma ou mais substituições de aminoácido em  
uma região Fc do anticorpo. Alternativamente ou adicionalmente, os resí-  
duos de cisteína podem ser introduzidos na região Fc, desse modo permitin-  
25 do formação de ligação dissulfeto intercadeia nessa região. O anticorpo ho-  
modimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização aperfeiçoa-  
da e/ou morte celular mediada por complemento aumentada e citotoxicidade  
celular dependente de anticorpo (ADCC). Vide Caron e outros, *J. Exp Med.*  
176:1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Os  
30 anticorpos homodiméricos com atividade antitumor intensificada podem tam-  
bém ser preparados usando reticuladores heterobifuncionais como descrito  
em Wolff e outros, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente,

um anticorpo pode ser elaborado, o qual tem regiões Fc duplas e pode, desse modo, ter capacidades de lise de complemento e ADCC intensificadas. Vide Stevenson e outros, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) descreve anticorpos com função ADCC  
5 aperfeiçoada na presença de células efetoras humanas, onde os anticorpos compreendem substituições de aminoácidos na região Fc desses. Preferencialmente, o anticorpo com ADCC aperfeiçoada compreende substituições nas posições 298, 333, e/ou 334 da região Fc (numeração EU de resíduos). Preferencialmente, a região Fc alterada é uma região Fc de IgG1 humano  
10 compreendendo ou consistindo em substituições em uma, duas ou três dessas posições. Tais substituições são opcionalmente combinadas com substituições que aumentam a ligação C1q e/ou CDC.

Os anticorpos com ligação C1q e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) são descritos em WO 99/51642, Patente US Nº  
15 6.194.551B1, Patente US Nº 6.242.195B1, Patente US Nº 6.528.624B1 e Patente US Nº 6.538.124 (Idusogie e outros). Os anticorpos compreendem uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da região Fc desse (numeração EU de resíduos).

20 Para aumentar a meia-vida de soro do anticorpo, um pode incorporar um epítipo de ligação com receptor de salvação no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito na Patente US Nº 5.739.277, por exemplo. Como usado aqui, o termo "epítipo de ligação com receptor de salvação" refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula  
25 IgG (por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, ou IgG<sub>4</sub>) que é responsável por aumentar a meia-vida de soro in vivo da molécula IgG.

Os anticorpos com ligação aperfeiçoada com o receptor Fc neonatal (FcRn), e meias-vidas aumentadas, são descritos em WO 00/42072 (Presta, L.) e US 2005/0014934A1 (Hinton e outros). Esses anticorpos  
30 compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições nesta que aperfeiçoam a ligação da região Fc com FcRn. Por exemplo, a região Fc pode ter substituições em uma ou mais posições 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303,

305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ou 434 (numeração EU de resíduos). A variante de anticorpo compreendendo a região Fc preferencial com ligação FcRn aperfeiçoada compreende substituições de aminoácidos em uma, duas, ou três das posições 5 307, 380 e 434 da região Fc desse (numeração EU de resíduos).

Os anticorpos elaborados com três ou mais (preferencialmente quatro) sítios de ligação com antígeno funcionais são também observados (Pedido US Nº US 2002/0004587 A1, Miller e outros).

As moléculas de ácido nucléico codificando variantes de sequência de aminoácido do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido naturalmente ocorrendo) ou preparação por mutagenese mediada por oligonucleotídeo (ou direcionada a sítio), mutagenese 10 PCR, e mutagenese de cassete de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante do anticorpo. 15

(viii) Exame por anticorpos com as propriedades desejadas

As técnicas para gerar anticorpos foram descritas acima. Um pode adicionalmente selecionar anticorpos com certas características biológicas, como desejado. 20

Para identificar um anticorpo que bloqueia ativação de ligante de um receptor HER, a capacidade do anticorpo bloquear a ligação de ligante de HER a células expressando o receptor HER (por exemplo, em conjugação com outro receptor HER com o qual o receptor HER de interesse forma uma HER (hetero-oligômero) pode ser determinada. Por exemplo, as células naturalmente expressando, ou transfectadas para expressar receptores HER do hetero-oligômero de HER podem ser incubadas com o anticorpo e então expostas ao ligante HER etiquetado. A capacidade do anticorpo bloquear a ligação do ligante com o receptor HER no hetero-oligômero de HER pode 25 então ser avaliada. 30

Por exemplo, a inibição de ligação HRG com as linhagens de células tumores de mama MCF7 por anticorpos contra HER2 pode ser e-

xecutada usando culturas de MCF7 monocamada em gelo em um formato de placa com 24 cavidades essencialmente como descrito na Patente US Nº 6.949.245. Os anticorpos monoclonais contra HER2 podem ser adicionados a cada cavidade e incubados por 30 minutos. rHRG $\beta$ 1177-224 etiquetado  
5 125I (25 pm) pode então ser adicionado, e a incubação pode ser continuada por 4 a 16 horas. As curvas de resposta a dose podem ser preparadas e um valor IC50 pode ser calculado para o anticorpo de interesse. Em uma modalidade, o anticorpo que bloqueia a ativação do ligante de um receptor HER terá um IC50 para inibir ligação HRG com células MCF7 nesse ensaio de  
10 aproximadamente 50 nM ou menos, mais preferencialmente 10 nM ou menos. Quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como o segmento Fab, o IC50 para inibir ligação HRG a células MCF7 nesse ensaio pode, por exemplo, ser aproximadamente 100 nM ou menos, mais preferencialmente 50 nM ou menos.

15 Alternativamente, ou adicionalmente, a capacidade de um anticorpo para bloquear fosforilação de tirosina estimulada por ligante de HER de um receptor HER presente em um hetero-oligômero de HER pode ser avaliada. Por exemplo, as células expressando de forma endógena os receptores HER ou transfectadas para expressá-los podem ser incubadas com  
20 o anticorpo e então ensaiadas para atividade de fosforilação de tirosina dependente de ligante de HER usando um antifosfotirosina monoclonal (que é opcionalmente conjugado com uma etiqueta detectável). O ensaio de ativação de receptor de quinase descrito na Patente U.S. Nº 5.766.863 está também disponível para determinar ativação de receptor HER e bloqueio dessa  
25 atividade por um anticorpo.

Em uma modalidade, um pode examinar por um anticorpo que inibe estimulação HRG de fosforilação de tirosina p180 em células MCF7 essencialmente como descrito na Patente U.S. Nº 6.949.245. Por exemplo, as células MCF7 podem ser laminadas em placas de 24 cavidades e anti-  
30 corpos monoclonais contra HER2 podem ser adicionados a cada cavidade e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, então rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> pode ser adicionado a cada cavidade em uma concentração final de 0,2 nM,

e a incubação pode ser continuada por 8 minutos. Os meios podem ser aspirados a partir de cada cavidade, e as reações podem ser paradas pela adição de 100 µl de tampão de amostra de SDS (5% SDS, 25 mM DTT, e 25 mM Tris-HCl, pH 6,8). Cada amostra (25 µl) pode ser submetida à eletroforese em um gel de gradiente 4-12% (Novex) e então transferida de forma eletroforética à membrana de difluoreto de polivinilideno. Immunoblots de Antifosfotirosina (a 1 µg/ml) podem ser desenvolvidas, e a intensidade da banda reativa predominante em  $M_r$  -180.000 pode ser quantificada por densitometria de refletância. O anticorpo selecionado preferencialmente significativamente inibirá estimulação HRG de fosforilação de tirosina p180 em aproximadamente 0-35% de controle nesse ensaio. Uma curva de resposta à curva para inibição de estimulação HRG de fosforilação de tirosina p180 como determinado por densitometria de refletância pode ser preparada e um IC50 para o anticorpo de interesse pode ser calculado. Em uma modalidade, o anticorpo que bloqueia a ativação de ligante de um receptor HER terá um IC50 para inibir a estimulação HRG de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio de aproximadamente 50 nM ou menos, mais preferencialmente 10 nM ou menos. Quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, o IC50 para inibir estimulação HRG de fosforilação de tirosina p180 nesse ensaio pode, por exemplo, ser aproximadamente 100 nM ou menos, mais preferencialmente 50 nM ou menos.

Um pode também avaliar os efeitos inibidores de crescimento do anticorpo em células MDA-MB-175, por exemplo, essencialmente como descrito em Schaefer e outros, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997). De acordo com esse ensaio, as células MDA-MB-175 podem ser tratadas com um anticorpo monoclonal contra HER2 (10 µg/mL) por 4 dias e manchadas com violeta cristal. A incubação com um anticorpo contra HER2 pode mostrar um efeito inibitório de crescimento nessa linhagem celular similar ao exibido pelo anticorpo monoclonal 2C4. Em uma modalidade adicional, HRG exógeno não reverteria significativamente essa inibição. Preferencialmente, o anticorpo será capaz de inibir proliferação celular de células MDA-MB-175 a uma extensão maior do que o anticorpo monoclonal 4D5 (e opcionalmente a uma

extensão maior do que o anticorpo monoclonal 7F3), ambos na presença e ausência de HRG exógeno.

Para identificar anticorpos contra HER2 inibidores de crescimento, um pode examinar por anticorpos que inibem o crescimento de células cancerígenas que superexpressam HER2. Em uma modalidade, o anticorpo inibidor de crescimento de escolha é capaz de inibir o crescimento de células SK-BR-3 em cultura celular por aproximadamente 20-100% e preferencialmente aproximadamente 50-100% em uma concentração de anticorpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar tais anticorpos, o ensaio SK-BR-3 descrito na Patente U.S. Nº 5.677.171 pode ser executado. De acordo com esse ensaio, as células SK-BR-3 são cultivadas em uma mistura 1:1 de F12 e o meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina e estreptomicina + penicilina. As células SK-BR-3 são laminadas em 20.000 células em um prato de cultura de 35 mm (2 mls/35 mm prato). 0,5 a 30 µg/ml do anticorpo contra HER2 é adicionado por prato. Após seis dias, o número de células, comparado a células não tratadas são contados usando um contador de células eletrônico COULTER™. Esses anticorpos que inibem o crescimento das células SK-BR-3 em aproximadamente 20-100% ou aproximadamente 50-100% podem ser selecionados como anticorpos inibidores de crescimento. Vide Patente U.S. Nº 5.677.171 para ensaios para exame para anticorpos inibidores de crescimento, tal como 4D5 e 3E8.

Com a finalidade de selecionar os anticorpos que induzem apoptose, um ensaio de ligação de anexina usando células BT474 é disponível. As células BT474 são cultivadas e semeadas em pratos como discutido no parágrafo anterior. O meio é então removido e substituído com meio fresco sozinho ou meio contendo 10 µg/ml do anticorpo monoclonal. Seguindo um período de incubação de três dias, as monocamadas são lavadas com PBS e desconectadas por tripsinização. As células são então centrifugadas, res-suspensas em um tampão de ligação  $Ca^{2+}$  e divididas em alíquotas em tubos como discutido acima para o ensaio de morte celular. Os tubos então recebem anexina etiquetada (por exemplo, anexina V-FTIC) (1µg/ml). As amostras podem ser analisadas usando um citômetro de fluxo FACSCAN™ e

software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Esses anticorpos que induzem níveis estatisticamente significativos de ligação de anexina em relação a controle são selecionados como anticorpos de indução de apoptose. Em adição ao ensaio de ligação de anexina, o ensaio de coloração de DNA usando células BT474 está disponível. Com a finalidade de executar esse ensaio, as células BT474 que foram tratadas com o anticorpo de interesse como descrito nos dois parágrafos anteriores são incubadas com 9µg/ml de HOECHST 33342™ por 2 horas em 37°C, então analisadas em um citômetro de fluxo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Os anticorpos que induzem uma mudança na porcentagem de células apoptóticas que é duas vezes ou mais (e preferencialmente 3 vezes ou mais) do que as células não tratadas (mais de 100% de células apoptóticas) podem ser selecionados como anticorpos pró-apoptóticos usando esse ensaio. Vide WO 98/17797 para ensaios para exame de anticorpos que induzem apoptose, tal como 7C2 e 7F3.

Para examinar anticorpos que se ligam a um epítipo em ligação com HER2 por um anticorpo de interesse, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser executado para avaliar se os blocos cruzados de anticorpo se ligando a um anticorpo, tal como 2C4 ou pertuzumabe, a HER2. Alternativamente, ou adicionalmente, o mapeamento de epítipo pode ser executado por métodos conhecidos na técnica e/ou um pode estudar a estrutura anticorpo-HER2 (Franklin e outros, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para vide qual domínio(s) de HER2 está/estão ligados pelo anticorpo.

#### (ix) Composições de Pertuzumabe

Em uma modalidade de uma composição de anticorpo contra HER2, a composição compreende uma mistura de um anticorpo pertuzumabe de espécie principal e uma ou mais variantes desse. A modalidade preferencial aqui de um anticorpo de espécie principal pertuzumabe é um compreendendo as sequências de aminoácido de cadeia leve e pesada variáveis nos ID de SEQ N<sup>os</sup> 3 e 4, e mais preferencialmente compreendendo uma

sequência de aminoácido de cadeia leve de ID SEQ Nº 7, e uma sequência de aminoácido de cadeia pesada de ID SEQ Nº 8 (incluindo variantes desamidadas e/ou oxidadas dessas sequências). Em uma modalidade, a composição compreende uma mistura do anticorpo pertuzumabe de espécie principal e uma variante de sequência de aminoácido desse compreendendo uma extensão guia de terminal amino. Preferencialmente, a extensão guia de terminal amino está em uma cadeia leve da variante de anticorpo (por exemplo, em uma ou duas cadeias leves da variante de anticorpo). O anticorpo contra HER2 de espécie principal ou a variante de anticorpo pode ser um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmentos Fab de F(ab=)2), mas preferencialmente ambos são anticorpos de comprimento completo. A variante de anticorpo aqui citada pode compreender uma extensão guia de terminal amino em qualquer uma ou mais das cadeias leve ou pesada desse. Preferencialmente, a extensão guia de terminal amino está em uma ou duas cadeias leves do anticorpo. A extensão guia de terminal amino preferencialmente compreende ou consiste em VHS. A presença da extensão guia de terminal amino na composição pode ser detectada por várias técnicas analíticas incluindo, mas não limitadas a, análise de sequência de terminal N, ensaio para heterogeneidade de carga (por exemplo, cromatografia de troca de cátions ou eletroforese de zona capilar), espectrometria de massa, etc. A quantidade da variante de anticorpo na composição geralmente está na faixa de uma quantidade que constitui o limite de detecção de qualquer ensaio (preferencialmente análise de sequência de terminal N) usado para detectar a variante em uma quantidade menor do que a quantidade do anticorpo de espécie principal. Geralmente, aproximadamente 20% ou menos (por exemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, por exemplo, de 5% a aproximadamente 15%) das moléculas de anticorpo na composição compreende uma extensão guia de terminal amino. Tais quantidades de porcentagem são preferencialmente determinadas usando análise de sequência de terminal N quantitativa ou análise de troca de cátions (preferencialmente usando uma coluna de troca de cátions fraca, de alta resolução, tal como coluna de troca de cátions

PROPAC WCX-10™). À parte da variante de extensão guia de terminal amino, alterações de sequência de aminoácidos adicionais do anticorpo de espécie principal e/ou variante são observadas, incluindo, mas não limitadas a um anticorpo compreendendo um resíduo de lisina de terminal C em uma ou  
5 ambas as cadeias pesadas desse, uma variante de anticorpo desamidada, etc.

Além disso, o anticorpo de espécie principal ou variante pode adicionalmente compreender variações de glicosilação, exemplos não-limitantes dos quais incluem anticorpo compreendendo estrutura de oligo-  
10 sacarídeo G1 ou G2 anexada à região Fc dessa, anticorpo compreendendo uma porção de carboidrato anexada a uma cadeia leve desse (por exemplo, uma ou duas porções de carboidrato, tal como glicose ou galactose, anexada a uma ou duas cadeias leves do anticorpo, por exemplo, anexada a um  
15 ou mais resíduos de lisina), anticorpo compreendendo uma ou duas cadeias pesadas não-glicosiladas, ou anticorpo compreendendo um oligossacarídeo sialidated anexado a uma ou duas cadeias pesadas desse, etc.

A composição pode ser recuperada a partir de uma linhagem celular geneticamente elaborada, por exemplo, uma linhagem celular de O-  
vário de Hamster Chinês (CHO) expressando o anticorpo contra HER2, ou  
20 pode ser preparado por síntese de peptídeo.

(x) Composições de Trastuzumabe

A composição de trastuzumabe geralmente compreende uma mistura de um anticorpo de espécie principal (compreendendo sequências de cadeia leve e pesada de ID SEQ N<sup>os</sup> 9 e 10, respectivamente), e formas  
25 variantes desse, em variantes ácidas particulares (incluindo variantes desaminadas). Preferencialmente, a quantidade de tais variantes ácidas na composição é menor do que aproximadamente 25%. Vide, Patente U.S. N<sup>o</sup> 6.339.142. Vide, também, Harris e outros, J. Chromatography, B 752:233-245 (2001) considerando formas de trastuzumabe dissolvido por cromatografia por troca de cátions, incluindo Pico A (Asn30 desamidado em Asp em  
30 ambas as cadeias leves), Pico B (Asn55 desamidado para isoAsp em uma cadeia pesada), Pico 1 (Asn30 desamidado para Asp em uma cadeia leve),

Pico 2 (Asn30 desamidado para Asp em uma cadeia leve, e Asp102 isomerizado para isoAsp em uma cadeia pesada), Pico 3 (forma de pico principal, ou anticorpo de espécie principal), Pico 4 (Asp102 isomerizado para isoAsp em uma cadeia leve), e Pico C (succinimida Asp102 (Asu) em uma cadeia pesada). Tais formas variantes e composições são incluídas na invenção aqui citada.

(xi) Imunoconjugados

A invenção também pertence a imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado para um agente citotóxico tal como um agente quimioterápico, toxina (por exemplo, uma toxina de pequena molécula ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, de planta ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes desses), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

Os agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Os conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de pequena molécula, tais como calicheamicina, uma maitansina (Patente U.S. Nº 5.208.020), um tricoteno, e CC1065 são também observados aqui.

Em uma modalidade preferencial da invenção, o anticorpo é conjugado para uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticorpo). A maitansina pode, por exemplo, ser convertida em May-SS-Me que pode ser reduzida a May-SH3 e reagida com anticorpo modificado (Chari e outros, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para gerar um imunoconjugado de anticorpo-maitansinóide.

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado para uma ou mais moléculas de calicheamicina. A família de antibióticos calicheamicina é capaz de produzir quebras de DNA de filamento duplo em concentrações sub-picomolares. Os análogos estruturais de calicheamicina que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a,  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-acetil- $\gamma_1^I$ , PSAG e  $\theta_1^I$  (Hinman e outros, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) e Lode e outros. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Vide, tam-

bém, Patente U.S. Nºs 5.714.586, 5.712.374, 5.264.586, e 5.773.001 expressamente incorporadas aqui por referência.

As toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos dessas que podem ser usadas incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não ligantes de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*),  
5 cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor momordica charantia, curcina, crotonina, inibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina,  
10 cina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, WO 93/21232 publicado em 28 de Outubro de 1993.

A presente invenção adicionalmente observa um imunocongugado formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA tal como  
15 uma desoxiribonuclease, DNase).

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

20 Conjugados do anticorpo e do agente citotóxico podem ser feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tal como HCL de dimetil adipimidato), ésteres  
25 ativos (tal como suberato de disuccinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-ativo (tal como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imuno-  
30 toxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta e outros, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminepentacético (MX-DTPA) rotulado Carbono-14 é um agente quelante exemplifica-

do para conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Vide WO 94/11026. O ligador pode ser um "ligador clivável" facilitando a liberação do fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, um ligador ácido-lábil, ligador peptidase-sensível, ligador dimetil ou ligador contendo dissulfeto (Chari e outros, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) pode ser usado.

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

Outros imunocjugados são observados aqui. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a um de uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo também pode ser aprisionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), em sistemas de liberação de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Oslo, A., Ed., (1980).

Os anticorpos descritos aqui podem ser também formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985), Hwang e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980), Patente U.S. N<sup>os</sup> 4.485.045 e 4.544.545, e WO 97/38731 publicado em 23 de Outubro de 1997. Os lipossomas com tempo de circulação intensificado são descritos na Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.013.556.

Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizados de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros de

tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados para os lipossomas como descrito em Martin e outros, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) via uma reação de intercâmbio de dissulfeto. Um agente quimioterápico está opcionalmente contido no lipossoma. Vide Gabizon e outros, *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

(xii) Docetaxel

O docetaxel é um agente antineoplásico que se liga à tubulina livre e promove a montagem de tubulina em microtúbulos estáveis enquanto simultaneamente inibindo sua montagem. Isso leva à produção de feixes de microtúbulos sem função normal e à estabilização de microtúbulos, bloqueando as células na fase M do ciclo de célula e levando à morte celular.

III. Selecionando paciente para a terapia

A presente invenção considera o tratamento de paciente que têm câncer de mama metastático de HER2 positivo e não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica (incluindo vacina ou inibidores de tirosina quinase/HER aprovados ou investigacionais) para sua doença metastática. Os pacientes podem ter recebido tratamento de câncer de mama sistêmico no ajuste neo-adjuvante ou adjuvante, já que o paciente experimentou um intervalo livre da doença (DFI) de  $\geq 12$  meses para completar o tratamento sistêmico adjuvante (excluindo terapia hormonal) para diagnóstico metastático. Os pacientes podem ter recebido trastuzumabe e/ou um taxeno durante o tratamento adjuvante ou neo-adjuvante.

A detecção de superexpressão de proteína HER2 é importante para a seleção de pacientes para o tratamento de acordo com a presente invenção. Vários ensaios comerciais aprovados pela FDA estão disponíveis para identificar pacientes com câncer de mama cujo câncer superexpressa HER2. Esses métodos incluem HERCEPTEST™ (Dako) e PATHWAY® HER2/neu (ensaios de imunohistoquímica (IHC)) e PathVysion® e HER2 FISH pharmDx™ (ensaios FISH). Os usuários deveriam se referir às bulas de kits de ensaio específicos para informação na validação e desempenho de cada ensaio.

Por exemplo, a superexpressão de HER2 pode ser analisada por IHC, por exemplo, usando HERCEPTEST® (Dako). Seções de tecido embutidas em parafina a partir de uma biópsia de tumor podem ser submetidas ao ensaio IHC e concordadas com critérios de intensidade de coloração de proteína HER2 como segue:

Pontuação 0 – Nenhuma coloração é observada ou coloração de membrana é observada em menos de 10% de células de tumor.

Pontuação 1+ - uma fraca coloração de membrana dificilmente perceptível é detectada em mais de 10% das células tumorais. As células são somente coloridas em parte de sua membrana.

Pontuação 2+ - uma coloração de fraca a moderada da membrana completa é observada em mais de 10% das células tumorais.

Pontuação 3+ - uma coloração de moderada a forte de membrana completa é observada em mais de 10% das células tumorais.

Esses tumores com pontuações 0 ou 1+ para avaliação de superexpressão de HER2 podem ser caracterizados como não superexpressão de HER2, sendo que esses tumores com pontuações 2+ ou 3+ podem ser caracterizados como superexpressando HER2.

Os tumores superexpressando HER2 podem ser classificados por pontuações imunohistoquímicas correspondentes ao número de cópias de moléculas de HER2 expressas por célula, e podem ser determinados bioquimicamente:

0 = 0-10.000 cópias/célula,

1+ = ao menos aproximadamente 200.000 cópias/célula,

2+ = ao menos aproximadamente 500.000 cópias/célula,

3+ = ao menos aproximadamente 2.000.000 cópias/célula.

A superexpressão de HER2 no nível 3+, que leva à ativação independente de ligante da tirosina quinase (Hudziak e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 (1987)), ocorre em aproximadamente 30% dos cânceres de mama, e nesses pacientes, a sobrevida livre de reincidência e a sobrevida global são diminuídas (Slamon e outros, *Science*, 244:707-712 (1989), Slamon e outros, *Science*, 235:177-182 (1987)).

A presença de superexpressão de proteína HER2 e a amplificação de gene estão altamente correlacionadas, portanto, alternativamente, ou adicionalmente, o uso de ensaios FISH para detectar a amplificação de gene pode também ser empregado para seleção de pacientes apropriados para tratamento de acordo com a presente invenção. Os ensaios FISH tal como o INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) ou PathVysion® (Vysis, Illinois) podem ser executados em tecido tumoral embutido em parafina fixadas por formalina para determinar a extensão (se houver alguma) da amplificação de HER2 no tumor.

Mais comumente, o estado HER2 positivo é confirmado usando tecido tumoral embutido em parafina arquivado, usando quaisquer dos métodos anteriores.

Preferencialmente, os pacientes HER2 positivo tendo uma pontuação IHC 3+ ou uma relação de amplificação FISH 2,0 são selecionados para tratamento de acordo com a presente invenção.

#### IV. Formulações Farmacêuticas

As formulações farmacêuticas dos anticorpos contra HER2 usados de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando-se um anticorpo tendo o grau desejado de pureza com carreadores farmacêuticamente aceitáveis opcionais, excipientes ou estabilizantes (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), geralmente na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os cristais de anticorpos são também observados (vide Pedido de Patente U.S. 2002/0136719). Os carreadores, excipientes, ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos, antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina, conservantes (tal como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, fenol, butil ou benzil álcool, alquil parabenos tal como metil ou propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, e m-cresol), polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos), proteínas, tal como albumina de

soro, gelatina, ou imunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona, aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina, monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas, agentes quelantes tais como EDTA, açúcares tais como sacarose, manitol, trealose, ou sorbitol, contra-íons de formação de sal tal como sódio, complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína Zn), e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). As formulações de anticorpo liofilizado são descritas em WO 97/04801, expressamente incorporadas aqui por referência.

As formulações de anticorpo liofilizado são descritas nas Patentes U.S. Nºs 6.267.958, 6.685.940 e 6.821.515, expressamente incorporadas aqui por referência. A formulação de HERCEPTIN® (trastuzumabe) preferencial é um pó liofilizado livre de conservantes amarelo pálido a branco estéril para administração intravenosa (iv), compreendendo 440 mg de trastuzumabe, 400 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalose dihidrato, 9,9 mg HCl de L-histidina, 6,4 mg de L-histidina, e 1,8 mg de polisorbato 20, USP. A reconstituição de 20 mL de água bacteriostática para injeção (BWFI), contendo 1,1% de álcool benzílico como um conservante, produz uma solução de múltiplas doses contendo 21 mg/mL de trastuzumabe, em pH de aproximadamente 6,0. Para detalhes adicionais, vide informação de prescrição de trastuzumabe.

A formulação de pertuzumabe preferencial para uso terapêutico compreende 30 mg/mL de pertuzumabe em 20 mM de acetado de histidina, 120 mM de sacarose, 0,02% de polissorbato 20, em pH 6,0. Uma formulação de pertuzumabe alternativa compreende 25 mg/mL de pertuzumabe, 10 mM de tampão histidina-HCl, 240 mM de sacarose, 0,02% de polissorbato 20, pH 6,0.

A formulação do placebo usado nos exames clínicos descritos nos Exemplos é equivalente a pertuzumabe, sem o agente ativo.

A formulação aqui citada pode também conter mais do que um composto ativo se necessário para a indicação particular sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente uma a outra. Vários fármacos que podem ser combinados com o

inibidor de dimerização de HER são descritos na Seção Método abaixo. Tais moléculas são adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de liberação de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>a</sup> edição, Oslo, A., Ed., (1980).

As preparações de liberação sustentadas podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, matrizes que estão na forma de artigos formados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactidas (Patente U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não-degradável, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradáveis tais como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

As formulações a serem usadas para administração in vivo devem ser estéreis. Isso é prontamente executado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

#### V. Métodos de Tratamento

Os métodos de tratamento da presente invenção compreendem, consistem essencialmente, ou consistem na administração de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização de HER2 e um taxeno. Em uma modalidade particular, os métodos de tratamento da presente invenção compreendem, consistem essencialmente, ou consistem na administração de uma ligação de anticorpo essencialmente ao

epítopo 2C4, um anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno para pacientes com câncer de mama metastático HER2 positivo como acima definido, que não receberam anteriormente quimioterapia ou terapia biológica para sua doença metastática. Em uma modalidade preferencial, o tratamento compreende, consiste essencialmente ou  
5 consiste em tratamento com pertuzumabe + trastuzumabe + docetaxel. Os métodos de tratamento aqui citados podem resultar em um benefício cinérgico, terapêutico, ou mais do que aditivo ao paciente.

A terapia de acordo com a presente invenção estende a sobrevida livre de progressão (PFS) e/ou a sobrevida global (OS) do tratamento do  
10 paciente. Em uma modalidade, o tratamento estende PFS ou OS ao menos aproximadamente 5%, ou ao menos aproximadamente 10%, ou ao menos aproximadamente 15% ou ao menos aproximadamente 20%, ou ao menos aproximadamente 25% mais do que PFS ou OS alcançado por administração de trastuzumabe + docetaxel ao paciente com câncer de mama metastático a ser tratado.  
15

Os anticorpos se ligando essencialmente ao epítopo 2C4 especificamente incluem, sem limitação, rhuMAb 2C4 (pertuzumabe). Os anticorpos se ligando essencialmente ao epítopo 4D5 especificamente incluem, sem limitação, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 (trastuzumabe).  
20

Os anticorpos e taxeno, tal como pertuzumabe, trastuzumabe, e docetaxel são administrados a um paciente humano de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como um bolus ou por infusão contínua por um período de tempo, por vias intramuscular, intraperitoneal, intracérebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica e inalação. Para anticorpos, a administração intravenosa é preferencial.  
25

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma dose fixa de inibidor de dimerização de HER (por exemplo, pertuzumabe) de  
30 aproximadamente 840 mg (dose de carga) é administrada, seguida por uma ou mais doses de aproximadamente 420 mg (dose(s) de manutenção) do

anticorpo. As doses de manutenção são preferencialmente administradas aproximadamente a cada 3 semanas, por um total de ao menos duas doses, até doença progressiva clínica ou radiográfica, ou toxicidade não controlável, preferencialmente até 17 ou mais doses.

5 O anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento preferencialmente é trastuzumabe, que tipicamente é administrado como uma dose de carga intravenosa de aproximadamente 8 mg/kg, seguida pela administração de doses de 6 mg/kg em ciclos subsequentes. O trastuzumabe é tipicamente administrado a cada 3 semanas até que doença progressiva clínica ou radio-  
10 gráfica ou toxicidade não controlável, preferencialmente até 17 ou mais doses.

O taxeno preferencialmente é docetaxel, que é tipicamente administrado como uma dose IV de 75 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas por ao menos 6 ciclos até doença progressiva clínica ou radiográfica ou toxicidade não controlável.

15 Os anticorpos contra HER2 preferencialmente são administrados como anticorpos nus. Entretanto, o inibidor administrado pode ser conjugado com um agente citotóxico. Preferencialmente, o inibidor conjugado e/ou antígeno ao qual ele está ligado está internalizado pela célula, resultando em eficácia terapêutica aumentada do conjugado em matar a célula cancerígena  
20 a qual ele se liga. Em uma modalidade preferencial, o agente citotóxico direciona ou interfere com o ácido nucléico na célula cancerígena. Exemplos de tais agentes citotóxicos incluem maitansinóides, calicheamicinas, ribonucleases e endonucleases de DNA.

Em uma modalidade, o tratamento inicia a administração de per-  
25 tuzumabe, ou anticorpo inibidor de dimerização de HER2, seguido por administração de trastuzumabe ou outro anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento e um taxeno, por exemplo, docetaxel, no dia seguinte. Em outra modalidade, o tratamento inicia com trastuzumabe, ou outro anticorpo inibidor de dimerização de HER2, e um taxeno, por exemplo, docetaxel. Em ain-  
30 da outra modalidade, todos os três agentes são administrados no mesmo dia, em qualquer ordem.

As dosagens e protocolos de tratamento descritos aqui são para

propósitos de informação somente, e podem ser alterados por um médico versado na técnica considerando os fatores específicos ao paciente e o câncer a ser tratado, tal como a idade, o peso, a condição física total, o histórico de tratamento do paciente, a gravidade e o tipo do câncer de mama a ser tratado, a extensão e natureza da metástase, e seus similares.

#### VI. Depósito de Materiais

As seguintes linhagens celulares de hibridoma foram depositadas com a American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

10	<b>Designação do Anticorpo</b>	<b>ATCC Nº</b>	<b>Data de Depósito</b>
	7C2	ATCC HB-12215	17 de Outubro de 1996
	7F3	ATCC HB-12216	17 de Outubro de 1996
	4D5	ATCC CRL 10463	24 de Maio de 1990
	2C4	ATCC HB-12697	8 de Abril de 1999

15               Esses depósitos foram feitos sob os fornecimentos do Tratado de Budapeste para o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Fins de Patente e as Regulações sob esse tratado. Isso assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito por 30 anos a partir da data de depósito. Os depósitos serão tornados disponíveis pela

20 ATCC sob os termos do Tratado de Budapeste, e submetidos a um acordo entre Genentech, Inc. e ATCC, que assegura que todas as restrições impostas pelo depositador na disponibilidade ao público do material depositado serão removidas de forma irrevogável mediante a concessão da Patente U.S. pertinente, assegura disponibilidade permanente e irrestrita da progênie da

25 cultura do depósito ao público mediante emissão da Patente U.S. pertinente ou mediante deixar aberta ao público de qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeira, o que vier primeiro, e assegura disponibilidade da progênie a um determinado pelo Comissário de Patentes e Marcas U.S. a ser intitulado a

esse de acordo com 35 USC § 122 e as regras do Comissário de acordo com esse (incluindo 37 CFR § 1.14 com referência particular a 886 OG 638).

30

Detalhes adicionais da invenção são ilustrados pelos seguintes Exemplos não-limitantes. As descrições de todas as citações na especifica-

ção são expressamente incorporadas aqui por referência.

Glossário de Abreviações:

	FACT-B	Avaliação Funcional de Terapia de Câncer de Mama
	FFPE	Embutido em parafina fixado em formalina
5	FISH	Hibridização in situ por fluorescência
	GGT	Gama glutamil transferase
	ICH	Conferência Internacional de Harmonização
	IHC	Imunohistoquímica
	ITT	Intenção de tratar
10	IV	Intravenoso
	JVP	Pressão Venosa Jugular
	LDH	Lactato desidrogenase
	LLN	Limite abaixo do normal
	MBC	Câncer de mama metastático
15	MRI	imagem de ressonância magnética
	NCI-CTC	Critérios de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer
	NCI-CTCAE	Critérios de Terminologia Comum do Instituto Nacional do Câncer para Eventos Adversos
	ORR	Taxa de resposta objetiva
20	OS	Sobrevida global
	PD	Doença Progressiva
	PFS	Sobrevida livre de progressão
	PK	Farmacocinético
	RP	resposta parcial
25	PS	Estado de Desempenho
	aRTT	tempo de tromboplastina parcial ativada
	RECIST	Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos
	SAE	Evento adverso sério
	SD	Doença estável
30	TOI-PFB	Índice de Resultado de Tentativa – Função médica da mama
	ULN	Limite acima do normal

Exemplo 1

Estudo Clínico de Fase III para avaliar a eficácia e segurança do tratamento de Pertuzumabe + Trastuzumabe + Docetaxel de Câncer de Mama Metástico Anteriormente Não Tratado

5 Objetivos Primários

O objetivo primário desse estudo é comparar a sobrevida livre de progressão (PFS) baseado nas avaliações de tumor por uma instalação de revisão independente (IRF) entre paciente em dois braços de tratamento:

10 Placebo + trastuzumabe + docetaxel versus pertuzumabe + trastuzumabe + docetaxel.

Objetivos Secundários

- Comparar a sobrevida global (OS) entre os dois braços
- Comparar PFS entre os dois braços de tratamento com base na avaliação do investigador de progressão
- 15 - Comparar a taxa de resposta objetiva total entre os dois braços de tratamento
- Comparar a duração da resposta objetiva entre os dois braços de tratamento
- Comparar o perfil de segurança entre os dois braços de tratamento
- 20 - Comparar o tempo de progressão dos sintomas, se avaliado pelo Índice de Resultado de Tentativa – Função médica da mama (TOI-PFB)
- Avaliar se biomarcadores de tecidos tumorais ou amostras sanguíneas (por exemplo, expressão de HER3, Fcγ, e ECD/HER2 de soro
- 25 e/ou concentrações de ligantes de HER) se correlacionam com os resultados clínicos.

População Alvo

O estudo arrola 800 pacientes de aproximadamente sítios pelo mundo. A população de estudo é pacientes com câncer de mama metástico

30 HER2 positivo (MBC) que não foram anteriormente tratados com quimioterapia e/ou terapia biológica para seu MBC. Pacientes com doença no Estágio IV em apresentação de doença inicial bem como aqueles que progrediram

seguindo ou terapia neo-adjuvante ou adjuvante com um intervalo livre de doença de ao menos 12 meses são incluídos, e eles podem ter recebido trastuzumabe e/ou taxenos no ajuste adjuvante.

#### Fármaco Investigacional

- 5 O fármaco investigacional é pertuzumabe em combinação com trastuzumabe e docetaxel, comparado à administração de placebo em combinação com trastuzumabe e docetaxel.

#### Pertuzumabe/Placebo Cego

- 10 Pertuzumabe/Placebo são administrados como uma dose de carga IV de 840 mg para o Ciclo I, e 420 mg para os ciclos subsequentes. Pertuzumabe/Placebo são administrados a cada 3 semanas até doença progressiva clínica ou radiográfica avaliada por investigador, ou toxicidade incontrolável. A administração pode ser retardada para avaliar ou tratar eventos adversos tais como eventos adversos cardíacos ou mielossupressão.
- 15 Nenhuma redução de dose é permitida.

- Se o paciente perde uma dose de pertuzumabe/placebo para 1 ciclo (isto é, os 2 tempos de administração sequencial são 6 semanas ou mais espaçadas), uma dose de recarga de pertuzumabe/placebo (840 mg) deveria ser dada. Se a recarga é exigida para um dado ciclo, as 2 terapias de estudo deveriam ser dadas na mesma programação como Ciclo 1, isto é, pertuzumabe/placebo no Dia 1, e trastuzumabe e docetaxel no Dia 2. Doses de pertuzumabe de manutenção subsequentes de 420 mg são então dadas a cada 3 semanas, iniciando 3 semanas mais tarde.
- 20

- Como a formulação de pertuzumabe/placebo não contém um conservante, a vedação do frasco pode somente ser perfurada uma vez. Qualquer solução restante deveria ser descartada.
- 25

- O volume indicado de solução de pertuzumabe/placebo deveria ser retirado dos frascos e adicionado a uma IV bolsa de 250 cc de 0,9% de injeção de cloreto de sódio.
- 30

#### Trastuzumabe

O trastuzumabe é administrado como uma IV dose de carga de 8 mg/kg para o Ciclo 1, e 6 mg/kg para os ciclos subsequentes. A dose de

trastuzumabe não necessita ser recalculada a menos que o peso corporal tenha mudado em mais de  $\pm 10\%$  da linha de base.

O trastuzumabe é administrado a cada 3 semanas até a doença progressiva clínica ou radiográfica avaliada por investigador, ou toxicidade incontrolável. A administração pode ser retardada para avaliar ou tratar eventos adversos tais como eventos adversos cardíacos ou mielossupressão. Nenhuma redução de dose é permitida.

Se o paciente perde uma dose de trastuzumabe para 1 ciclo (isto é, os 2 tempos de administração sequenciais são 6 semanas ou mais espaçados), uma dose de recarga de pertuzumabe/placebo (8 mg/kg) deveria ser dada. Se a recarga é exigida para um dado ciclo, as 3 terapias de estudo deveriam ser dadas na mesma programação como Ciclo 1, isto é, pertuzumabe/placebo no Dia 1, e trastuzumabe e docetaxel no Dia 2. Doses de trastuzumabe de manutenção subsequentes de 6 mg/kg são então dadas a cada 3 semanas, iniciando 3 semanas mais tarde.

Para administração, cada frasco de trastuzumabe de 150 mg é reconstituído com 7,2 mL de Água estéril para Injeção (SWFI). Essa formulação não contém um conservante e é adequada para único uso somente.

Cada frasco de trastuzumabe de 440 mg é reconstituído com 20 mL ou de SWFI ou de Água Bacteriostática para Injeção (BWFI), USP, 1,1% de benzil álcool preservado, como fornecido. Se o trastuzumabe é reconstituído com SWFI, ele é adequado para único uso somente.

A solução reconstituída contém 21 mg/mL de trastuzumabe, em um pH de aproximadamente 6,0, e o volume calculado apropriado será adicionado a 250 mL de Injeção de Cloreto de Sódio 0,9. O volume apropriado é calculado (em mL) usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso corporal (em kg)} \times \text{Dose (8 mg/kg para carga ou 6 mg/kg para manutenção)} / 21 \text{ mg/mL (concentração de solução reconstituída)}$$

#### Docetaxel

O docetaxel é administrado como uma IV dose de 75 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas por ao menos 6 ciclos até a doença progressiva clínica ou radiográfica avaliada por investigador, ou toxicidade incontrolável. Na discre-

ção do médico que está tratando, a dose de docetaxel é aumentada a 100 mg/m<sup>2</sup> para pacientes que toleram ao menos 1 ciclo sem quaisquer das seguintes toxicidades, neutropenia febril, neutropenia de grau 4 por >5 dias ou ANC <100/μL por mais de 1 dia, ou outras toxicidades não hemtoloicais de Grau > 2 (NCI/CTCAE, Versão 3). Para detalhes adicionais, referir-se à bula do docetaxel.

#### Programação de Tratamento

Para o primeiro ciclo de tratamento, pertuzumabe/placego cego é dado no Dia 1 por 60 minutos seguido por um período de observação de 60 minutos. Trastuzumabe e docetaxel são administrados no Dia 2 do Ciclo 1 usando as diretrizes para administração.

Se a administração de todos os três agentes é bem tolerada no Ciclo 1, eles podem ser dados sequencialmente no Dia 1 em ciclos subsequentes depois desse. Se o sujeito não pode tolerar todos os três fármacos dados no mesmo dia, a programação de dosagem do Ciclo 1 (pertuzumabe/placebo no Dia 1, trastuzumabe e docetaxel no Dia 2) é seguida.

Se um ou ambos os fármacos de estudo de anticorpo monoclonal necessitam ser permanentemente descontinuados ou são mantidos por mais de dois ciclos, o sujeito é tirado do tratamento de estudo. Entretanto, se o docetaxel necessita ser permanentemente descontinuado por razões relacionadas à toxicidade, o sujeito pode continuar com fármacos de estudo de anticorpo monoclonal.

#### Critérios de Inclusão

##### Critérios de Inclusão Específicos de Doença

1. Adenocarcinoma da mama histológica ou citologicamente confirmado com doença metástico ou localmente recorrente, e candidato para quimioterapia. Pacientes com lesão mensurável e não mensurável são adequados.

A doença localmente recorrente não precisa ser amenizável para resseção com intenção curativa.

Nota: Pacientes com doença em Estágio IV novamente são adequados.

2. MBC HER2 positivo (definido como IHC 3+ ou relação de amplificação FISH  $\geq 2,0$ ) confirmado por um laboratório central designado por responsável. É fortemente recomendado que um bloco de tecido embutido em parafina fixado por formalina (FFPE) do tumor primário seja enviado para confirmação no laboratório central de adequabilidade de HER2, entretanto, se isso não é possível, 25 fatias recentemente cortadas e descoloridas serão enviadas. (O tecido será subseqüentemente usado para avaliação de biomarcadores).

Critérios de Inclusão Gerais:

10

3. Idade  $\geq 18$  anos

15

4. Fração de Ejeção Ventricular Esquerda (LVEF)  $\geq 50\%$  na linha de base (em 42 dias de randomização) como determinado ou por ECHO ou MUGA (ECHO é o método preferencial. Se o paciente é randomizado, o mesmo método de avaliação de LVEF, ECHO ou MUGA, deve ser usado por todo o estudo, e à extensão possível, ser obtido na mesma instituição). Todos os valores de LVEF de pré-estudo e tratamento adjuvante pós-trastuzumabe para pacientes que receberam tal terapia adjuvante antes de alistamento no estudo serão coletados.

20

5. Estado de Desempenho de Grupo de Oncologia Cooperativo do Leste (ECOG)  
(PS) 0 ou 1

25

6. Para mulheres com potencial para procriar, o acordo para usar uma forma eficaz de contracepção (paciente e/ou parceiro, por exemplo, esterilização cirúrgica, um método de barreira confiável) e para continuar seu uso pela duração do tratamento de estudo e pelos 6 meses depois da última dose de tratamento de estudo.

30

7. Consentimento informado escrito assinado (aprovado pelo Quadro de Revisão Institucional ou Comitê de Ética Independente) obtido antes de qualquer procedimento de estudo.

Critérios de Exclusão Relacionados ao Câncer

1. Histórico de terapia anticâncer para MBC (com a exceção de um regime hormonal anterior para MBC). Isso inclui qualquer EGFR ou a-

gentes anti-HER2 ou vacinas, quimioterapia citotóxica, ou mais de um regime hormonal anterior para MBC.

2. Histórico de inibidores de tirosina quinase/HER investigativos ou aprovados para câncer de mama em qualquer configuração de tratamento, exceto trastuzumabe usado na configuração neo-adjuvante ou adjuvante.

3. Histórico de tratamento de câncer de mama sistêmico na configuração neo-adjuvante ou adjuvante com um intervalo livre de doença a partir do término do tratamento sistêmico (excluindo a terapia hormonal) para diagnóstico metástico de < 12 meses.

4. Histórico de toxicidade hematológica de Grau persistente  $\geq 2$  resultando de terapia adjuvante anterior.

5. Neuropatia periférica atual de NCI-CTCAE, Versão 3,0, Grau  $\geq 3$  em randomização.

6. Histórico de outras malignidades nos últimos 5 anos, exceto pelo carcinoma in situ do carcinoma de célula basal ou cérvix.

7. Evidência radiográfica ou clínica atual de metástases de sistema nervoso central (CNS). A varredura CT ou MRI do cérebro é obrigatória (nos 28 dias de randomização) em casos de suspeita clínica de metástases no cérebro.

8. Histórico de exposição às seguintes doses cumulativas de antraciclina:

- doxorubicina ou doxorubicina lipossômica  $> 360 \text{ mg/m}^2$

- epirubicina  $> 720 \text{ mg/m}^2$

- mitoxantrona  $> 120 \text{ mg/m}^2$  e idarubicina  $> 90 \text{ mg/m}^2$

- outros (por exemplo, doxorubicina lipossômica ou outra antraciclina  $>$  o equivalente de  $360 \text{ mg/m}^2$  de doxorubicina)

- se mais de 1 antraciclina foi usada, então a dose cumulativa não precisa exceder o equivalente de  $360 \text{ mg/m}^2$  de doxorubicina.

#### Função Hematológica, Bioquímica, e de Órgão

9. Hipertensão não controlada atual (sistólica  $> 150 \text{ mmHg}$  e/ou diastólica  $> 100 \text{ mmHg}$ ) ou angina instável

10. Histórico de CHF de quaisquer critérios da New York Heart

Association (NYHA), ou arritmia cardíaca séria exigindo tratamento (exceção, fibrilação atrial, taquicardia acimaventricular paroxística).

11. Histórico de infarto no miocárdio em 6 meses de randomização.

12. Histórico de declínio LVEF para abaixo de 50% durante ou depois de terapia anterior neo-adjuvante ou adjuvante de trastuzumabe.

13. Dispneia atual no resto devido às complicações de malignidade avançada, ou outras doenças que exigem terapia com oxigênio contínua.

#### Critérios de Exclusão Gerais

14. Função de órgão inadequada, evidenciada pelos seguintes resultados de laboratório em 28 dias antes da randomização:

- Contagem de neutrófilos absoluta  $< 1.500$  células/mm<sup>3</sup>

- Contagem de Plaquetas  $< 100.000$  células/mm<sup>3</sup>

- Hemoglobina  $< 9$  g/dL

- Bilirrubina total  $>$  limite acima do normal (ULN) (a menos que o paciente tenha documentado síndrome de Gilbert)

- AST (SGOT) e ALT (SGPT)  $> 2,5 \times$  ULN

- AST (SGOT) ou ALT (SGPT)  $> 1,5 \times$  ULN com fosfatase alcalina de soro  $> 2,5 \times$  ULN (a menos que metástases de osso estejam presentes)

- creatinina de soro  $> 2,0$  mg/dL ou  $177$   $\mu$ mol/L

- relação normalizada internacional (INR) e tempo de trombo-plastina parcial (aPTT)  $> 1,5 \times$  ULN (a menos que em coagulação terapêutica)

15. Doença sistêmica não controlada grave atual (por exemplo, doença cardiovascular, pulmonar, ou metabólica clinicamente significativa, desordens de cicatrização da ferida, úlceras, ou fraturas nos ossos).

16. Procedimento cirúrgico principal ou lesão traumática significativa em 28 dias antes do início do tratamento de estudo ou antecipação da necessidade por cirurgia principal durante o curso do tratamento de estudo.

17. Mulheres grávidas ou lactantes.

18. Histórico de recebimento de qualquer tratamento investigacional nos 28 dias de randomização.

19. Infecção conhecida atual com HIV, HBV ou HCV.

20. Recebimento de antibióticos IV para infecção nos 14 dias de

randomização.

21. Tratamento diário crônico atual com corticoesteróides (dose de 10 mg/dia de metilprednisolona equivalente) (excluindo esteróides inalados).

22. Hipersensibilidade conhecida a qualquer dos fármacos de estudo.

23. Avaliado pelo investigador a ser incapaz ou não desejando obedecer às exigências do protocolo.

### Avaliações

#### Eficácia

10 O ponto final primário é PFS baseado em avaliações IRF. PFS é definido como o tempo a partir da randomização à primeira doença progressiva radiográfica documentada, como determinado pelo IRF usando RECIST atual (Therasse e outros, 2000), ou morte por qualquer causa, o que ocorra primeiro.

15 A meningite carcinomatosa diagnosticada por avaliação citológica de fluido espinhal cerebral também definirá doença progressiva. A fotografia médica também ser permitida para monitorar recorrências na parede torácica de lesões subcutâneas.

20 A sobrevida global é o ponto final secundário chave, e é definida como o tempo a partir da data de randomização até a data de morte por qualquer causa.

#### Segurança

- Medidas de resultados de segurança são como segue:
- Incidência de eventos de disfunção sistólica ventricular esquerda sintomática (Insuficiência cardíaca congestiva (CHF)) e de fração de ejeção ventricular esquerda assintomática
- medições LVEF durante o curso do estudo
- Incidência e gravidade de eventos adversos (AEs) e eventos adversos sérios (SAEs)
- Anormalidades de teste de laboratório

#### 30 Farmacocinéticas/QT (Subestudo)

Um subconjunto de principais investigadores e pacientes participa em um subestudo farmacocinético, de interação fármaco-fármaco, e de

intervalo QTc como detalhado em um protocolo separado (vide Exemplo 2). A aprovação IRB/IEC e o Formulário de Consentimento Informado serão exigidos para participação no subestudo.

#### Qualidade de Vida/Farmacoeconomia

5                   Avaliações de Resultados Relatados pelo paciente: Este estudo usa a Avaliação Funcional da Terapia do Câncer de Mama (FACT-B), Versão 4. A FACT-B tem uma pontuação genérica de 28 itens para todos os pacientes, mais nove itens específicos para o câncer de mama. Os pacientes avaliam todos os itens em uma escala de cinco pontos na faixa de "de modo algum" a "muito". A FACT-B fornece classificações avaliatórias de domínio complementar ou pesos de utilidade, assim fornecendo uma estimativa da importância relativa de cada qualidade de domínio de vida para um paciente individual. A FACT-B fornece uma pontuação QoL total bem como informação sobre bem-estar físico, bem-estar social/família, bem-estar funcional, e considerações específicas à doença. A FACT-B tem sido usada extensivamente e tem demonstrado confiabilidade, validade, e sensibilidade para mudar pelo tempo. Somente pacientes fêmeas nesse estudo serão questionados para completar o questionário FACT-B.

10

15

#### Avaliações Fármaco-econômicas

20                   Uma avaliação econômica comparando vários custos entre os dois braços de tratamento é conduzida para avaliar hospitalizações enquanto em tratamento de estudo. O número de visitas ao hospital, número de dias admitidos, e tipo de visitas (sala de emergência versus atendimento hospitalar) serão coletados. Essa informação será coletada a partir da informação enviada em formulários de relatório de caso eletrônico AE e SAE (eCRFs).

25

#### Coleta de Amostra

30                   Amostras de tumor de arquivo a partir do tumor primário (ou sítios metastáticos, se o tumor primário não está disponível) são enviadas a partir de todos os sujeitos durante o exame e enviadas a um laboratório de patologia central para avaliação de estado de HER2 via IHC e FISH para adequabilidade do estudo, bem como para a avaliação de biomarcadores de tecido tumoral para predição de resposta a pertuzumabe/trastuzumabe. As

amostras de tecido tumoral são enviadas na forma de ou blocos de parafina ou fatias recentemente cortadas sem coloração contendo tecido tumoral fixado por formalina. Como os processos de oxidação não controlados nas fatias pode afetá-las, os blocos de tecido tumoral são preferenciais. Entretanto, se um bloco de tumor não está disponível, 25 fatias recentemente cortadas sem coloração de 4  $\mu\text{m}$  são enviadas (o número de fatias enviadas pode ser reduzido dependendo das exigências regulatórias e de IEC de alguns países). As fatias precisam ser enviadas ao laboratório central dentro de 2 dias de serem cortadas. A partir dos blocos de tumor enviados, no laboratório central, um máximo de 15 fatias serão cortadas e 2 núcleos serão removidos de modo a construir microarranjos de tecido (TMAs) para análise posterior. A parte restante do bloco de tumor será retornada à instituição. O teste de HER2 será priorizado e o tecido será subsequentemente usado para avaliação de biomarcadores.

15 Para a avaliação de biomarcadores de tecido tumoral, uma variedade de metodologias de análise pode ser usada, incluindo, mas não limitada a, qRT-PCR, IHC, hibridização in situ, e perfil de expressão de gene. No fim do processo de coleta, as metodologias analíticas mais adequadas serão selecionadas e empregadas.

#### 20 Construção de Microarranjo de Tecido (TMA)

Os blocos de tumor são também usados para configurar um TMA: um máximo de 2 núcleos de tecido de 1,5 mm cada um são obtidos usando um punçador e então re-arranjados como um arranjo em um bloco de cera. Um único arranjo pode incluir núcleos de tecido a partir de diferentes pacientes. Esse processo protege o tecido contra oxidação e permite armazenamento em longo prazo e análise posterior.

Para análise posterior, as seções de tecido podem ser geradas usando o último microarranjo de tecido. Essa tecnologia permite uma análise de alto rendimento (muitas amostras de pacientes em uma fatia de vidro) de biomarcadores.

#### 30 Extração de DNA/RNA

Os blocos de tumor enviados são usados para gerar seções em

fatias de vidro para a extração de DNA e RNA de tumor para análise posterior. Essas fatias são preparadas em um laboratório central para assegurar a mesma qualidade para todas as amostras e em estudos posteriores. Nota-se que como tumorigênese é um processo de múltiplas etapas ligado a eventos somáticos, a análise de DNA focará em mutações esporádicas especificamente encontradas em tecido tumoral, mas não mudanças herdadas encontradas no corpo todo. Para esse propósito, algumas seções contendo tumor serão obtidas do bloco e usadas para o processo de extração. As amostras de tecido tumoral serão armazenadas na instalação do patrocinador do estudo ou uma instalação de laboratório de contrato por até 7 anos depois do fechamento da base de dados, no tempo em que as amostras serão destruídas.

#### Amostras de Tecido Tumoral Metástico para Análise de Biomarcador (Opcional)

Se uma biópsia do tecido tumoral metástico do paciente está disponível, ela é enviada a partir do consentimento do paciente em linha de base (depois que o paciente determinou como sendo adequado para o estudo, mas antes da primeira administração de medicação de estudo) para a avaliação de biomarcadores de tecido tumoral para predição de resposta a pertuzumabe/trastuzumabe.

#### Amostras de soro para Análise de ECD/HER2 e Ligantes de HER

Para avaliação de biomarcadores de soro que podem indicar resposta a pertuzumabe e trastuzumabe, amostras de soro (de uma retirada de sangue de aproximadamente 5 mL) são coletadas na linha de base (depois que o paciente foi determinado como sendo adequado para o estudo, mas antes da primeira administração de medicação de estudo) e durante o estudo na hora de cada avaliação de tumor. Avaliações de biomarcador com essas amostras incluirão níveis de ECD/HER2, ligantes de HER selecionados, e/ou marcadores sendo importantes para a sinalização de família HER ou resposta a inibidores de HER e ativação de HER. Sobras de amostras podem ser usadas para re-teste ou para desenvolver e validar testes de diagnósticos existentes e/ou novos referidos a pertuzumabe ou trastuzumabe, ou ambos.

Amostra de Sangue Integral para Análise de Polimorfismo Fcy (Genotipagem Clínica)

Uma amostra de sangue integral (3 mL) para avaliação de polimorfismo Fc $\gamma$  é coletada a partir de pacientes na linha de base (depois que o paciente foi determinado como sendo adequado para o estudo, mas antes da primeira administração de medicação de estudo). Uma análise de polimorfismo de receptor Fc $\gamma$  é correlacionada com resultados clínicos de modo a adicionalmente avaliar o mecanismo de ação de ambos trastuzumabe e pertuzumabe. A coleta de sangue obrigatória para análise polimórfica dependerá das exigências regulatórias e/ou de IEC dos países individuais.

5  
10 Soro e Plasma para Pesquisa de Repositório de Amostra de Biomarcador (BSR) (Opcional)

Amostras de sangue para extração de soro e amostras de plasma (aproximadamente 5 mL por amostra) para descoberta de biomarcador, validação, e aplicação serão coletadas a partir do consentimento dos pacientes. Essas amostras são coletas na linha de base (depois que o paciente foi determinando como sendo adequado para o estudo, mas antes da primeira administração de medicação de estudo) e durante o estudo a cada 9 semanas na hora da cada avaliação do tumor até doença progressiva determinada por IRF. A PD determinada por IRF ocorre antes do pós-tratamento da semana 18, amostras BSR continuarão a ser coletadas a cada 9 semanas até o pós-tratamento da semana 18.

15  
20  
25 As amostras BSR coletadas serão armazenadas com a instalação do patrocinador do estudo ou uma instalação de laboratório de contrato por até 15 anos depois do fim do estudo associado (fechamento da base de dados), hora na qual as amostras serão destruídas. Essas amostras serão usadas somente para propósitos de pesquisa para identificar biomarcadores dinâmicos que podem ser preditivos de resposta a tratamento com pertuzumabe e trastuzumabe (em termos de dose, segurança, tolerabilidade, e eficácia) e ajudarão a entender melhor a patogênese, curso e resultado do câncer de mama e doenças relacionadas e eventos adversos.

30 As amostras de sangue coletadas podem ser usadas para desenvolver e validar ensaios de diagnóstico e permitir a geração de dados de biomarcadores estatisticamente significativos relacionados a doença de cân-

cer de mama HER2 positivo ou resposta a pertuzumabe e/ou trastuzumabe. Desde que a identificação de novos marcadores que correlacionam com a atividade da doença e a eficácia ou segurança do tratamento está rapidamente se desenvolvendo, a lista definitiva de análise resta ser determinada.

## 5 Duração do Estudo

Os pacientes permanecem na fase de tratamento do estudo até a doença progressiva clínica ou radiográfica avaliada pelo investigador, toxicidade não controlável, ou término do estudo pelos patrocinadores. Os pacientes não receberão pertuzumabe de rótulo aberto depois da descontinua-  
10 ção do tratamento de estudo. Depois da descontinuação do tratamento de estudo, avaliações de tumor continuarão até progressão avaliada por IRF. Em adição, os pacientes serão seguidos pela sobrevida até a morte, perda de acompanhamento, retirada do consentimento, ou término do estudo pelos patrocinadores. As avaliações de tumor serão conduzidas a cada 9 semanas  
15 a partir da data de randomização. Retardos na administração do tratamento não causarão impacto no intervalo de avaliações de tumor. Se uma avaliação de tumor precisa ser executada anteriormente/posteriormente, as avaliações subsequentes serão conduzidas de acordo com a programação original de cada 9 semanas a partir da data de randomização. As avaliações de  
20 tumor precisam ser conduzidas até a doença progressiva (PD) determinada por IRF, mesmo se o tratamento foi descontinuado devido a um PD determinado por investigador ou toxicidade inaceitável.

Depois do término do tratamento de estudo, os pacientes continuarão a ser seguidos pela sobrevida até a morte, perda de acompanha-  
25 mento, ou término do estudo.

## Tamanho da Amostra

Um tamanho de amostra de 800 pacientes é necessário para fornecer 80% de energia para detectar um aperfeiçoamento de 33% em OS (HR = 0,75) no nível de significância de dois lados de 5%. Desde que ambas  
30 as análises PFS e OS são acionadas por evento, e para evitar período de espera prolongado depois da análise PFS final para dados OS para alcançar o número de eventos exigidos, a abordagem é projetada para arrolar o nú-

mero suficiente de pacientes tal que aproximadamente 50% das mortes exigidas serão observadas na hora da análise PFS final.

Assume-se que o OS médio no braço de controle é 36 meses e OS é exponencialmente distribuído, uma análise interina em 50% das mortes exigidas totais, e uma função de gasto alfa Lan-DeMets com o limite de parada O'Brien-Fleming, aproximadamente 385 mortes serão exigidas. Em adição, assume-se que a taxa real é aproximadamente 40 pacientes por mês depois de um período de rampa de 9 meses, 800 pacientes necessitarão ser alistados e seguidos por 29,5 meses adicionais para obter 385 mortes. O período de alistamento é estimado como sendo 26,5 meses, e 50% das mortes exigidas serão alcançadas em torno de 33,5 meses.

Assume-se que PFS é exponencialmente distribuído com uma média de 10,5 meses no braço de controle, é estimado que 381 eventos PFS avaliados por investigador, correspondendo a aproximadamente 448 eventos avaliados por investigador, terão ocorrido quando 50% das mortes exigidas (193 mortes) é alcançado. A análise primária de PFS será executada depois de 381 eventos avaliados por IRF terem ocorrido.

### Métodos Estatísticos

#### Análises de Eficácia

As análises de PFS, OS, e tempo de progressão de sintoma serão baseadas na população com intenção de tratar (ITT), definido como pacientes que foram randomizados. Para resposta objetiva, somente pacientes com doença mensurável na linha de base serão incluídos na análise. Para duração de resposta, somente os que respondem serão incluídos na análise. Todas as análises de eficácia serão baseadas no braço de tratamento ao qual os pacientes foram randomizados.

### Análise de Variável Primária

O ponto final primário é PFS baseado em avaliações IRF. Para pacientes que descontinuam tratamento de estudo devido a razões além da morte ou progressão avaliada por IRF, cada esforço será feito para continuar avaliações de tumor até doença progressiva determinada por IRF ou morte do paciente. Os dados para pacientes que não documentaram doença progressiva ou que não morreram dentro das 18 semanas da última avaliação de tumor serão verificados na hora da última avaliação de tumor estimada por IRF (ou, se nenhuma avaliação de tumor é executada depois da visita de linha de base, na hora da randomização mais 1 dia).

Para pacientes cuja progressão determinada por IRF não está disponível, substituir morte a qualquer hora como um evento progressivo pode artificialmente prolongar o tempo de PFS por causa de uma expectativa de vida muito maior nessa população de pacientes comparada com PFS. Portanto, somente mortes dentro das 18 semanas das últimas avaliações de tumor serão incluídas como um evento na análise primária. Entretanto, uma análise de sensibilidade será executada incluindo todas as mortes como um evento.

O teste "log-rank", estratificado por estado de tratamento anterior (terapia adjuvante ou neo-adjuvante anterior e novamente) e região (Europa, América do Norte, América do Sul, e Ásia), será usado para comparar PFS entre os dois braços de tratamento. Os resultados do teste de log-rank não estratificados serão também fornecidos como uma análise de sensibilidade. A abordagem de Kaplan-Meier será usada para estimar PFS média para cada braço de tratamento. O modelo de risco proporcional de Cox, estratificado por estado e região de tratamento anterior, será usado para estimar o HR entre os dois braços de tratamento (isto é, a magnitude do efeito do tratamento) e seu intervalo de confiança (CI) de 95%.

As análises mencionadas anteriormente serão executadas em subgrupos demográficos como apropriado. Por exemplo, a análise pode ser executada em subgrupos de pacientes com base na origem racial já que há um tamanho de amostra razoável nos subgrupos de interesse.

### Variáveis Secundárias

Sobrevida Global. Os pacientes que vivos ou perderam o acompanhamento na hora da análise serão censurados na última data viva conhecida. Os pacientes que sem informação pós-linha de base serão censurados na hora da randomização mais 1 dia. Os métodos de análise são os mesmos daqueles descritos para o ponto final primário. Para minimizar a chance de uma estimativa OS induzida resultante do acompanhamento programado de sobrevida a cada 18 semanas, imediatamente antes dos dados cortados para a análise PFS final e a análise OS final, os sítios investigativos contatarão cada paciente que está vivo para confirmar o estado de sobrevida atual. (O patrocinador do estudo notificará todos os investigadores do intervalo de tempo dessa varredura de dados de sobrevida).

PFS baseado em avaliações do investigador. Os dados para os pacientes que não documentaram doença progressiva ou que não morreram nas 18 semanas da última avaliação de tumor serão censurados na hora da última avaliação de tumor pelo investigador (ou, se nenhuma avaliação de tumor é executada depois da visita de linha de base, na hora da randomização mais 1 dia). Os métodos de análise são os mesmo daqueles descritos para o ponto final primário.

Resposta objetiva. Somente pacientes com doença mensurável na linha de base serão incluídos na análise da resposta objetiva. Os pacientes sem uma avaliação de tumor de linha de base serão considerados como sendo os que não respondem. A análise da resposta objetiva será baseada nas avaliações IRF.

Uma estimativa da taxa de resposta objetiva e seu CI de 95% será calculada para cada braço de tratamento. A diferença na taxa de resposta objetiva será também fornecida com Cys de 95%. O teste  $\chi^2$  de Mantel-Haenszel estratificado pelo estado e região de tratamento anterior será usado para comparar a taxa de resposta objetiva entre os dois braços de tratamento. Um resultado do teste exato de Fisher não ajustado será também fornecido como uma análise de sensibilidade.

Duração de resposta objetiva. Somente pacientes com uma resposta objetiva serão incluídos na análise de duração de resposta objetiva. O

método para manipular a censura é o mesmo do descrito para o ponto final primário. A análise de duração da resposta objetiva será baseada nas avaliações de IRF.

5 A duração média da resposta objetiva para cada braço será estimada usando a abordagem de Kaplan-Meier. A relação de risco entre os dois braços também será estimada usando regressão de Cox.

Tempo para progressão de sintomas. Uma diminuição de cinco pontos em TOI-PFB é considerada progressão de sintomas. Dados para pacientes que não têm progressão de sintomas observada serão censurados na  
10 última data de avaliação TOI-PFB observada. Se a avaliação de TOI-PFB de linha de base não está disponível, ou se não há avaliação de TOI-PFB pós-linha de base executada, os dados serão censurados na hora da randomização mais 1 dia. Os métodos de análise são os mesmos daqueles descritos para o ponto final primário.

15 Análises de Biomarcador. Para avaliar o efeito de marcadores molecular nos resultados de eficácia, esses serão resumidos para todos os pacientes, e pelo braço de tratamento, em cada subgrupo determinado pelos marcadores exploratórios. Os marcadores a serem considerados incluem o estado de receptores HER, ligantes de HER, Fc- $\gamma$ , antígenos dispersos (por  
20 exemplo, ECD/HER2), e outros marcadores relevantes para a rota da família HER. Ênfase especial será colocada em marcadores que mostraram associação com resultados clínicos em pacientes tratados com pertuzumabe em estudos anteriores:

25 Marcadores qRT-PCR: perfis de expressão de gene de tumor associados com ativação de HER2.

Marcadores de soro de linha de base: níveis de ECD/HER2 e ligantes de HER.

30 Resultados de eficácia considerados para essa análise incluirão PFS, taxa de resposta objetiva, e OS. O PFS e a resposta objetiva serão baseados nas avaliações de IRF.

As análises de biomarcador na hora do desenvolvimento do protocolo não tomam a forma de hipóteses fixadas de teste envolvendo cortes

específicos ou outras regras de predição pré-especificadas. É planejado para o Plano de Análise Estatística (a ser gerado antes de abrir os olhos dessa abordagem) usar toda evidência científica disponível a partir dos estudos independentes ou publicações para especificar regras de predição testadas.

- 5 Em adição, esse plano especificará nos devidos detalhes como as regras de predição adaptadas aos dados serão derivadas (por exemplo, pesquisa de corte sistemático) e como a multiplicidade/indução inerente será corrigida de modo a impedir conclusões induzidas.

10 A diferença no benefício do tratamento através dos estados do biomarcador definido por uma regra de predição adequada será avaliada testando-se o efeito de interação de tratamento e o estado de predição usando regressão de Cox para PFS e OS, e usando-se regressão logística para taxa de resposta. Esses modelos envolvendo um termo de interação também serão usados para estimar os resultados de eficácia condicionais, condicionais ao estado de predição do biomarcador ou braço de tratamento, 15 incluindo e excluindo os fatores de estratificação no modelo.

Covariáveis clínicas podem ser de valor prognóstico e poderiam interagir com o benefício do tratamento e com o estado do biomarcador. Os candidatos aqui são variáveis de linha de base de valor prognóstico descrevendo propriedades de tumor e estado de morbidez ou valores de laboratório 20 comuns. A predição do biomarcador será verificada envolvendo covariáveis clínicas relevantes, que poderiam ser parte da função de predição do biomarcador, se necessário.

25 Análises de Segurança. A segurança de pertuzumabe em combinação com tratuzumabe e quimioterapia será avaliada através de resumos de AEs, AEs específicos cardíacos, medições LVEF, e resultados de teste de laboratório. Os pacientes que recebem qualquer quantidade de tratamento de estudo serão incluídos em análises de segurança. Os resultados de segurança serão resumidos pelo tratamento que os pacientes realmente recebem.

Exemplo 2Farmacocinética, interação fármaco-fármaco, e subestudo de intervalo QTc

Esse subestudo em dois objetivos principais: (1) descrever os efeitos potenciais de pertuzumabe no intervalo QTc, e (2) avaliar o perfil farmacocinético de pertuzumabe na presença de trastuzumabe e docetaxel e descrever quaisquer interações fármaco-fármaco que devem ser observadas quando todos os três fármacos são co-administrados.

Prolongamento QTC

O prolongamento induzido por fármaco do intervalo QT/QT corrigido (QTc) resultando em susceptibilidade aumentada à arritmia cardíaca é uma complicação reconhecida de muitos fármacos através de um amplo espectro terapêutico (Morissette e outros, *Can J Cardiol* 2005; 21:857-64). O prolongamento do intervalo QT/QTc, que é usualmente assintomático, pode ser manifestado por síncope resultante de arritmias cardíacas tais como torções de pointes (TdP), arritmia ventricular, e morte cardíaca súbita (Morganroth *rnst Schering Res Found Workshop* 2007; 59:171-84).

A medição de QT é feita por um eletrocardiograma (ECG) e é um substituto para a re-polarização ventricular. O intervalo QT é definido como o tempo a partir do início do complexo QRS ao fim da onda T. Como o intervalo QT é inversamente relacionado à taxa cardíaca, as seguintes fórmulas são comumente usadas para corrigir o intervalo QT (Strevel e outros, *J Clin Oncol* 2007; 25:3362-71).

- Correção de Fridericia (QTcF):  $QTcF = QT/RR^{0,33}$

- Correção de Bazett (QTcB):  $QTcB = QT/RR^{0,5}$

QTc é considerado prolongado quando ele é maior do que 450 milissegundos (MS) de duração. O intervalo QT/QTc pode ser afetado pela localização da sonda do ECG, gênero, hora do dia, terapia com fármaco, ou condições congênitas. Vários fatores de predisposição podem influenciar arritmia induzida por fármaco secundária para QT/QTc prolongado, incluindo instabilidade de eletrólito, bradicardia, toxinas, doença cerebrovascular, inibição de citocromo p450, e inibição de p-glicoproteína (Kannankeril e Roden, *Curr Opin Cardiol* 2007; 22:39-43, Morissette e outros, 2005, acima).

O mecanismo comum de prolongamento de intervalo QT/QTc induzido por fármaco é o bloqueio direto dos canais de potássio específicos, codificados pelo gene relacionado a hERG éter-a-go-go humano, que regulam re-polarização cardíaca ou romper tráfico de proteína de canal hERG, ou ambos. Os fármacos foram classificados por sua propensão para prolongar o intervalo QTc, a classificação fornecida na Tabela 2 é comumente usada (Woosley <http://www.arizonacert.org> (atualizada como de 1 de Março de 2006)). Até agora, os fármacos conhecidos para bloquear canais de potássio são pequenas moléculas, tal como antiarrítmicos, alguns antibióticos, antieméticos, anti-histaminas, antipsicóticos, antidepressivos, bronquodilatadores, e alguns estimulantes do sistema nervoso central (CNS) (Morissette e outros, 2005m acima, Woosley 2006, acima). O sítio de ligação para bloqueio de canal de potássio está localizado em um domínio intracelular, um sítio que é difícil para grandes moléculas (isto é, anticorpos monoclonais) acessarem.

As classes de agentes terapêuticos de oncologia molecularmente direcionados associados com efeitos no intervalo QT foram identificadas, incluindo inibidores de proteína farnesil transferase, arsênico, inibidores de quinase Scr/Abl, inibidores de tirosina quinase multidirecionados, inibidores de histona desacetilase, agentes de rompimento vascular, e inibidores de proteína quinase C. Um mecanismo direto comum a esses agentes em associação com efeitos QT não foi descrito (Strelal e outros, *J Clin Oncol* 2007; 25:3362-71).

### Tabela 2

#### Classificação dos Fármacos por Propensão para Prolongar Intervalo QTc

Lista de Fármacos 1	Geralmente aceita por autoridades como tendo um risco de causar torsades de pointes
Lista de Fármacos 2	Fármacos que em alguns relatórios podem estar associados com torsades de pointes, mas nessa hora carecem de evidência substancial para causar torsades de pointes
Lista de Fármacos 3	Fármacos a serem evitados para uso em pacientes com síndrome QT longa congênita diagnosticada ou suspeita. Fármacos nas listas 1, 2 e 4 deveriam ser também evitados por pacientes com síndrome QT

Lista de Fármacos 4	Fármacos que, em alguns relatórios, foram fracamente associados com torsades de pointes, e/ou prolongamento QT, mas que são exclusivamente um risco para torsades de pointes quando usados nas dosagens recomendadas usuais e em pacientes com outros fatores de risco (por exemplo, fármacos de prolongamento de QT concomitante, bradicardia, distúrbios de eletrólito, síndrome de QT longo congênito, fármacos concomitantes que inibem metabolismo)
Fêmeas > Machos	Evidência substancial indica um risco maior usualmente > 2 vezes) de torsades de pointes em mulheres

#### Pertuzumabe – Mecanismo de Ação e Experiência Não-Clínica

Como descrito anteriormente, pertuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado baseado em sequências de estrutura ( $\kappa$ ) de IgG1 humano e consiste em duas cadeias pesadas (449 resíduos) e duas cadeias leves (214 resíduos). Como trastuzumabe (Herceptin<sup>®</sup>), pertuzumabe é produzido em células de ovário de hamster chinês (CHO) e é direcionado contra HER2. Entretanto, ele difere do trastuzumabe nas regiões de ligação com epítipo da cadeia leve (12 diferenças de aminoácidos) e cadeia pesada (29 diferenças de aminoácidos). Como um resultado, o pertuzumabe se liga a um epítipo diferente em HER2.

O pertuzumabe age bloqueando-se a associação de HER2 com outros membros da família HER, incluindo HER1 (EGFR), HER3, e HER4. Como um resultado, ele inibe sinalização intracelular iniciada com ligante através de duas rotas de sinal principais, quinase MAP e quinase PI3. A inibição dessas rotas de sinalização pode resultar em interrupção de crescimento e apoptose, respectivamente (Hanahan e Weinberg, *Cell* 2000; 100:57-70). Os dados não clínicos demonstraram que a superexpressão de HER2 não é exigida para a atividade antitumor de pertuzumabe.

Pró-arritmias secundárias a repolarização ventricular anormal e prolongamento de QT foram de interesse no desenvolvimento de fármacos. Duas diretrizes da Conferência Internacional em Harmonização (ICH) para

teste não clínico (S7B) e clínico (E14) foram recentemente desenvolvidas (Conferência Internacional em Harmonização de Exigências Técnicas para Registro de Farmacêuticos para Uso Humano 2005). Baseado nessas diretrizes, o efeito de pertuzumabe em QTc em pacientes com câncer de mama será investigado nesse subestudo.

De modo a completamente caracterizar quaisquer efeitos potenciais de pertuzumabe no coração, pontos finais cardíacos adicionais foram incluídos em dois estudos de toxicologia de múltiplas doses não clínicas executados para suportar o desenvolvimento clínico de pertuzumabe. Em um estudo de toxicidade e tóxico-cinético intravenoso de 7 semanas em macacos cinomolgus com um período de recuperação de 4 semanas (estudo 00-377-1821), telemetria foi medida em dois animais por sexo nos grupos de controle e de alta dose (150 mg/kg/dose) para coletar pontos finais eletrocardiográficos. Em dois pontos no tempo antes da iniciação do tratamento, e nos Dias 1 e 28, os animais telemedidos tinham pressão arterial sistólica, diastólica, média, batimento cardíaco, intervalo PR, QRS, QT, e dados ECG II. Quatro rastreamentos de 1 minuto foram coletados para cada animal de 2 a 22 horas depois da dosagem e interpretados por um cardiologista veterinário certificado. Em adição aos parâmetros químicos de soro de rotina avaliados, o soro foi também analisado para isozimas creatinina quinase e Troponina T em Dias de Estudo 2/3 e 44/45 para todos os animais. Em um estudo de toxicidade e tóxico-cinético intravenoso de 26 semanas com pertuzumabe em macacos cinomolgus com um período de recuperação de 8 semanas (Estudo 01-458-1821), ECG (sonda de superfície padrão) e medições de pressão arterial foram registrados em todos os animais. Registros foram obtidos em dois pontos no tempo antes da iniciação de tratamento e uma vez durante as semanas 4, 16 e 26 em animais anestesiados e foram interpretados por um cardiologista veterinário certificado. Em adição aos parâmetros químicos de soro de rotina avaliados, o soro foi também analisado para Troponina T na pré-dose do Dia 1 e nos Dias 114, 184 e 239 (recuperação) para todos os animais. Os resultados a partir de ambos os estudos de toxicidade de múltiplas doses concluíram que não houve evidência de lesões cardíacas

causadas por tratamento de pertuzumabe, como determinado por histopatologia, ausência de aumentos em parâmetros químicos de soro relevantes (Troponina T e isozimas creatina quinase), e ECGs normais, pressões sanguíneas, e batimentos cardíacos.

- 5                    Em exames clínicos como de Novembro de 2006, não houve associação notada de um aumento de TdP em pacientes tratados com pertuzumabe.

#### Farmacocinéticas de pertuzumabe

##### Sumário

- 10                    Os resultados fármacocinéticos (PK) observados em estudos anteriores com pertuzumabe não mostraram mudança em folga em doses de 2,0 a 15,0 mg/kg ((140 mg – 1050 mg para um paciente de 70 kg). Um modelo de dois compartimentos adequadamente descreveu os dados de tempo de concentração, com uma folga de soro sistêmica de aproximadamente
- 15                    0,24 L/dia e uma meia vida de terminal de aproximadamente 17 dias para um paciente típico. Baseado nesses dados, um intervalo de dosagem de 3 semanas é recomendado em estudos clínicos. Em estudos de Fase II, uma dosagem de carga de 840 mg (seguido por 420 mg a cada 3 semanas), levou ao alcance das concentrações de regime permanente de rebaixo ( $C_{min}$ )
- 20                    e de pico ( $C_{max}$ ) pelo segundo ciclo e alcançado um alvo PK de 20  $\mu\text{g/mL}$  (baseado nos modelos xenográficos de tumor pré-clínico). A modelagem PK de população de dados de estudos de Fase Ia e Fase II suporta o uso contínuo de dosagem fixa não baseada em peso em pacientes fêmeas. Não houve evidência de que o pertuzumabe causou impacto no PK de agentes
- 25                    quimioterápicos co-administrados (docetaxel e capecitabina em estudos de Fase Ib e gentamicina em um estudo de Fase II).

#### Farmacocinética em Estudos de Único Agente

- 30                    Em estudos de único agente de Fase II (Estudos TOC2689g e BO16934), os dados de concentração-tempo mostram que a dose de carga de 840 mg (seguida por 420 mg a cada 3 semanas) resultou no alcance de  $C_{min}$  e  $C_{max}$  de regime permanente pelo segundo ciclo, e também alcançou concentrações alvo de pertuzumabe de soro > 20  $\mu\text{g/mL}$  na maior parte dos

pacientes.  $C_{min}$  e  $C_{max}$  de soro médios para os dois primeiros ciclos de tratamento em pacientes com câncer de mama ovariano e metastático (MBC) são apresentados na Tabela 3. A Figura 6 mostra os perfis de concentração-tempo para os primeiros 84 dias.

5 Tabela 3

Concentrações em Soro de Rebaixo e de Pico médias ( $\pm$ SD) no Fim do Primeiro e Segundo Ciclos de Tratamento (estudos TOC2689g e BO16934)

Estudo	Dose	Ciclo 1		Ciclo 2	
		$C_{min}$ $\mu\text{g/mL}$	$C_{max}$ $\mu\text{g/mL}$	$C_{min}$ $\mu\text{g/mL}$	$C_{max}$ $\mu\text{g/mL}$
TOC2689g	420 mg	64,6 ( $\pm$ 20,9)	231,7	66,5 ( $\pm$ 38,0)	237,6
Câncer de Ovário	(n = 61)		( $\pm$ 50,6)		( $\pm$ 55,0)
	1050 mg	90,1 ( $\pm$ 68,1)	390,9	94,7 ( $\pm$ 47,3)	357,2
	(n = 62)		( $\pm$ 114,7)		( $\pm$ 112,4)
BO16934	420 mg	56,5 ( $\pm$ 21,2)	202,9	62,6 ( $\pm$ 21,1)	181,2
Câncer de Mama	(n = 40)		( $\pm$ 78,4)		( $\pm$ 63,0)
Metástico	1050 mg	75,9 ( $\pm$ 34,5)	425,6	136,6 ( $\pm$ 53,5)	542,9
	(n = 35)		( $\pm$ 166,9)		( $\pm$ 173,7)

Os parâmetros PK foram estimados usando um modelo de dois compartimentos (vide Tabela 4). A folga sistêmica média desses pacientes (0,225–0,285 L/dia), e o volume médio de distribuição do compartimento central (2,70 – 3,11 L; isto é, aproximadamente o volume de soro), foram similares àquelas observadas no estudo de Fase Ia (Estudo TOC2297g). A meia vida inicial média e a meia vida terminal média estavam também dentro das faixas observadas através de grupos de dose 2 – 15 mg/kg no estudo de Fase Ia.

**Tabela 4****Estimativas<sup>a</sup> de Parâmetros Farmacocinéticos de Pertuzumabe seguindo Infusão Intravenosa (Média ± SD)<sup>b</sup>**

Estudo	Grupo de Dose	CL (L/dia)	V <sub>c</sub> (L)	V <sub>ss</sub> (L)	t <sub>1/2</sub> inicial (dias)	t <sub>1/2</sub> terminal (dias)
TOC2689g (Câncer Ovariano)	420 mg (n=61)	0,244 ± 0,095	2,70 ± 0,39	4,73 ± 0,78	1,37 ± 0,12	16,2 ± 4,7
	1050 mg (n=62)	0,285 ± 0,119	3,11 ± 0,72	5,39 ± 1,31	1,34 ± 0,11	15,8 ± 5,2
BO16934 (Câncer de mama metástico)	420 mg (n=40)	0,255 ± 0,096	2,98 ± 0,67	5,12 ± 0,98	1,36 ± 0,13	16,3 ± 3,5
	1050 mg (n=35)	0,225 ± 0,121	2,95 ± 0,81	5,11 ± 1,12	1,39 ± 0,15	20,5 ± 8,1

CL = folga sistêmica; V<sub>c</sub> = volume do compartimento central; V<sub>ss</sub> = volume de distribuição em regime permanente; t<sub>1/2</sub> inicial = meia-vida de distribuição inicial; t<sub>1/2</sub> terminal = meia-vida terminal

<sup>a</sup>Parâmetros Farmaco-Cinéticos estimados por análise posterior do modelo farmacocinético de população de 2 compartimentos.

<sup>b</sup>Farmacocinética não executada para Estudo TOC2572g.

**Farmacocinética em Estudos de Terapia de Combinação**

- 5 As análises dos dados PK de estudos de Fase Ib de capecitabina (Estudo BO17003) e docetaxel (Estudo BO17021) indicam que pertuzumabe não altera o PK desses dois agentes citotóxicos. Em ambos os estudos, os parâmetros PK para pertuzumabe foram similares aos parâmetros PK obtidos em estudos com pertuzumabe de único agente.
- 10 A análise PK preliminar a partir de um estudo de Fase II para avaliar a eficácia de pertuzumabe em combinação com gentabina em pacientes com câncer de ovário resistente à platina (Estudo TOC3258g) indica que pertuzumabe não altera o PK de gentabina ou seu metabólito principal, dFdU. Em adição, as concentrações em soro de pertuzumabe foram similares às concentrações nos estudos de Fase II de único agente em câncer de
- 15 ovário e MBC (Estudos TOC2689g e BO16934).

### Regime de Dose de Pertuzumabe

Um regime de dosagem de pertuzumabe administrado a cada 3 semanas a pacientes em estudos de Fase II (Estudos TOC2689g e BO16934) usando uma dose de carga de 840 mg fixa (Equivalente a 12 mg/kg para um paciente de 70 kg) para Ciclo 1 de tratamento e uma dose de manutenção de 420 mg fixa (equivalente a 6 mg/kg para um paciente de 70 kg) para subsequentes ciclos de tratamento resultou em *C<sub>min</sub>* do soro de regime permanente de aproximadamente 60 µg/mL pelo segundo ciclo de tratamento. Em estudos xenográficos de resposta à dose não clínicos usando ratos pelados implantados com tumores de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e de câncer de mama (níveis de expressão de HER2 baixo e alto), > 80% de supressão de crescimento de tumor foi alcançada quando concentrações de rebaixo de regime permanente de pertuzumabe alcançaram 5–25 µg/mL. Assim, *C<sub>min</sub>* de regime permanente que foram observados em pacientes nos estudos de Fase II são maiores do que as concentrações mostradas como sendo eficazes em modelos de tumor animal, e, portanto, esperadas como resultando em um efeito biológico.

Uma análise PK de população preliminar dos estudos de Fase Ia (Estudo TOC2297g) e de Fase IIa (Estudos TOC2689g e BO16934), compreendendo um total de 153 pacientes (faixa de peso: 45,0 – 150,6 kg) e 1458 concentrações-pontos no tempo, mostrou que a variabilidade da população de concentração de rebaixo em regime permanente e exposição foram similares à dose fixa, dosagem baseada na área de superfície do corpo, e dosagem baseada no peso. Portanto, uma dose baseada na área de superfície do corpo ou no peso não foi superior a uma dose fixa. Esses dados suportam o uso continuado de uma dose fixa de pertuzumabe em pacientes fêmeas com MBC e câncer de ovário.

A dependência de folga de soro de pertuzumabe do peso corporal para ambos pacientes fêmeas e machos será avaliada adicionalmente usando todos os dados PK clínicos disponíveis a partir dos estudos com pertuzumabe.

## Objetivos

### Objetivos Farmacocinéticos

Os objetivos PK desse estudo são os seguintes:

5 - Caracterizar a farmacocinética de pertuzumabe em pacientes com MBC HER2 positivo, e comparar esses dados com dados PK de outros estudos clínicos.

- Caracterizar o potencial de uma interação fármaco-fármaco de pertuzumabe na farmacocinética de docetaxel (na presença de trastuzumabe), e na farmacocinética de trastuzumabe (na presença de docetaxel).

### 10 Objetivos de Eletrocardiograma

Os objetivos ECG são exploratórios e podem incluir o seguinte:

- Descrever o efeito de pertuzumabe na mudança de linha de base no intervalo QTc como calculado usando correção de Fridericia (QTcF).

15 - Descrever o efeito de pertuzumabe na mudança de linha de base no intervalo QTc como calculado usando correção de Bazett (QTcB).

- Descrever a proporção de pacientes com prolongamento de intervalo QTc e mudança de linha de base no intervalo QTc, calculado usando ambas as correções de Fridericia e de Bazett.

20 - Descrever o efeito de pertuzumabe nos seguintes parâmetros ECG: batimento cardíaco, intervalo QT, intervalo PR, e duração QRS.

### Projeto de Estudo

#### Descrição do Estudo

25 Esse é um estudo suplementar ao Estudo TOC4129g/WO20698 que é projetado para avaliar o efeito de pertuzumabe no intervalo QTc, adicionalmente avaliar a farmacocinética de pertuzumabe, e caracterizar a interação fármaco-fármaco de pertuzumabe em farmacocinética de docetaxel (na presença de trastuzumabe), e na farmacocinética de trastuzumabe (na presença de docetaxel).

30 Um sub-conjunto de sítios investigativos participando no Estudo TOC4129g/WO20698 participará nesse subestudo. Os pacientes nesses sítios que consentiram em participar e foram determinados como sendo adequados para alistamento no Estudo TOC4129g/WO20698 serão convidados a

participar nesse subestudo. A participação nesse subestudo é opcional, portanto, o consentimento informado para esse subestudo será obtido separadamente do consentimento para participar do Estudo TOC4129g/WO20698. A recusa em participar nesse subestudo não afetará a adequabilidade do paciente para o Estudo TOC4129g/WO20698. Cinquenta pacientes adequados (25 por braço de tratamento) serão alistados para esse subestudo.

Cada paciente alistado receberá tratamento como especificado em TOC4129g/WO20698. O Dia 1 de TOC4129g/WO20698 corresponderá ao Dia 1 desse subestudo.

Todos os pacientes participando desse subestudo terão alfa-1-glicoproteína ácida testada na linha de base por um laboratório local, em adição a testes de hematologia padrão e de química de soro no Estudo TOC4129g/WO20698.

Medições de ECG de 12 fios triplicadas serão obtidas durante o período de linha de base de pré-tratamento do Dia -7 ao Dia -1 (isto é, nos 7 dias anteriores ao Dia 1 do Ciclo 1), no Dia 1 do Ciclo 1, no Dia 3 do Ciclo 1, coincidentes com amostra PK de docetaxel de 23 horas, e no Dia 1 do Ciclo 3 (correspondendo a  $C_{min}$  e  $C_{max}$  em regime permanente de pertuzumabe/placebo). No Dia 1 do Ciclo 1 e do Ciclo 3, as medições ECG de 12 fios triplicadas serão obtidas nos seguintes pontos no tempo: -30 e -15 minutos pré-infusão de pertuzumabe/placebo (qualquer pré-medicação que é exigida antes da infusão de pertuzumabe/placebo deve ser dada entre esses dois pontos no tempo pré-dose), imediatamente pós-infusão de pertuzumabe/placebo, e 60 – 75 minutos pós-infusão de pertuzumabe/placebo. Os resultados de ECG serão enviados a um laboratório de cardiologia central para a determinação do intervalo QT/QTc, que será usado como os dados para esse subestudo.

Para minimizar as variações devido aos ritmos circadianos, as infusões de pertuzumabe/placebo de Ciclo 1 e Ciclo 3 deveriam ser administradas na mesma hora do dia, e as leituras de ECG de linha de base (Dia -7 a Dia -1) precisam ser obtidas na mesma hora correspondente do dia como as medições ECG de Ciclo 1 e de Ciclo 3. A gravidade do prolongamento de

QTc será graduada de acordo com os Critérios de Toxicidade Comuns do Instituto Nacional do Câncer para Eventos Adversos (NCI-CTCAE), Versão 3,0. Um algoritmo de tratamento é fornecido para guiar as decisões de tratamento de estudo com base no intervalo QT/QTc observado em cada ponto no tempo. Se a qualquer hora durante esse subestudo, o intervalo QTc exceder 500 ms ou um alto grau de artefato estiver presente no ECG, a consulta cardíaca com o laboratório central de ECG está disponível.

Amostras sanguíneas para avaliação PK de pertuzumabe serão retiradas antes e depois das infusões de pertuzumabe/placebo nos Ciclos 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 com uma amostra adicional retirada na Visita de Descontinuação de Tratamento (28 – 42 dias depois da última dose do tratamento de estudo). Nos ciclos 1 e 3, as amostras PK pós-pertuzumabe serão retiradas 60 – 75 minutos depois do fim da infusão de pertuzumabe/placebo para corresponder aos ECGs executados nesses dias.

As amostras sanguíneas para avaliação PK de trastuzumabe serão coletadas nos Ciclos 1 e 3, antes e depois das infusões de trastuzumabe.

As amostras sanguíneas para avaliação PK de docetaxel serão coletadas no Ciclo 1 nos pontos no tempo seguintes à iniciação de infusão de docetaxel (Ponto no tempo 0): 0,5 hora (durante a infusão), 1,0 hora (no fim da infusão, EOI), 1,25 horas (15 minutos depois da EOI), 2 horas (1 hora depois da EOI), 4 horas (3 horas depois da EOI), 6 horas (5 horas depois da EOI), 8 horas (7 horas depois da EOI), e 24 horas (Dia 3 do Ciclo 1, 23 horas depois da EOI).

#### Raciocínio para Projeto de Estudo

#### Raciocínio para Projeto de Estudo de QTc

O estudo avaliará o efeito de pertuzumabe no intervalo QTc em pacientes com MBC HER2 positivo. Normalmente, um estudo QTc completo é executado em voluntários saudáveis quando possível. Como o QTc é avaliado em uma população com câncer com múltiplos fatores de confusão (doença de linha de base, medicações de linha de base, incluindo antieméticos, antibióticos, e outras medicações de cuidado assistente), esse subestudo foi

projetado para descrever a mudança no intervalo QTc a partir da linha de base ao estado permanente em pacientes de controle com placebo e tratados com pertuzumabe. Se os paciente exigem antieméticos ou outras pré-medicações antes da infusão de pertuzumabe/placebo, eles precisam ser dados entre as duas pré-doses, medições de ECG em uma tentativa de controlar os efeitos da medicação concomitante no intervalo QT/QTc. O guia ICH recomenda que os estudos devam caracterizar o efeito de um fármaco no QT/QTc e executar gravações de ECG nos pontos do tempo em torno de  $C_{max}$ .

10                    Como determinado no guia E14 de ICH, a correção de Bazett geralmente sobre-corrige em taxas cardíacas elevas e subcorrige em taxas cardíacas abaixo de 60 batimentos por minuto (bpm). A correção de Fridericia foi escolhida como a correção primária porque ele leva em conta o efeito de taxas cardíacas alteradas no intervalo QT.

15                    As amostras PK de pertuzumabe serão retiradas na hora das leituras de ECG do Ciclo 1 do Ciclo 3 quando as concentrações terapêuticas em soro de pertuzumabe são esperadas para serem alcançadas. A exposição a pertuzumabe estará correlacionada a QTc. O Dia 1 do Ciclo 3 (assumindo ciclos de 21 dias) foi escolhido para medição de QTc em concentração de regime permanente com base nos estudos de Fase II, durante o qual uma dose de carga de 840 mg (seguida por 420 mg a cada 3 semanas) resultou no alcance de  $C_{min}$  e  $C_{max}$  em regime permanente pelo segundo ciclo. Portanto, a maior parte da população deveria estar em estado permanente pelo Ciclo 3.

25                    Embora um fármaco de comparação de controle positivo (por exemplo, moxifloxacina) seja recomendado por diretrizes ICH para validar a sensibilidade do ensaio, um fármaco de controle positivo não será administrado a pacientes nesse subestudo à medida que é sentido que o uso de uma medicação de controle positivo não seria ético em uma população de pacientes com câncer metastático. Ademais, os pacientes têm variabilidade de linha de base secundária para medicações já sendo administradas.

30                    Por recomendações ICH, taxas de eventos adversos selecionados, se ob-

servados (TdP, morte súbita, taquicardia ventricular, fibrilação e palpitação ventricular, síncope, e ataques) serão comparadas entre os pacientes de controle e os tratados com pertuzumabe, como parte de dados coletados para Estudo TOC4129g/WO20698. Adicionalmente, a incidência de prolongamento de intervalo QTc e a mudança de linha de base no intervalo QTc serão resumidas.

#### Raciocínio para Amostragem Farmacocinética

O esquema de amostragem proposto para avaliações de concentração de pertuzumabe nesse subestudo deveria permitir a caracterização adequada de farmacocinéticas de pertuzumabe. Os resultados de concentração de pertuzumabe serão comparados com os dados disponíveis de outros estudos clínicos de pertuzumabe. Em adição, os dados de concentração de pertuzumabe serão usados para modelagem PK de população para gerar estimativas de parâmetro PK. Esses dados podem também contribuir para uma futura análise PK de população para investigar o efeito de covariáveis fisiológicas e relacionadas à doença em parâmetros PK.

O estudo TOC4129g/WO20698 propõe combinar pertuzumabe com trastuzumabe e docetaxel. Com base em mecanismos de folga para pertuzumabe, não há expectativa de que pertuzumabe alterará a farmacocinética do docetaxel. Entretanto, as concentrações de docetaxel serão medidas para avaliar uma interação potencial relacionada a PK entre docetaxel e pertuzumabe (na presença de trastuzumabe). Em adição, as concentrações de trastuzumabe serão medidas para avaliar uma interação potencial relacionada a PK entre trastuzumabe e pertuzumabe (na presença de docetaxel).

A farmacocinética na faixa de dose não será executada, e uma dose acima-terapêutica não será administrada no Estudo TOC4129g/WO20698,

#### Medidas de Resultado

Medidas de Resultado Farmacocinético: as medidas de resultado PK são as seguintes:

- Concentrações em soro de pertuzumabe mínima e máxima observadas ( $C_{min}$  e  $C_{max}$ ), e estimativas de parâmetro PK (CL, AUC,  $V_d$ ,  $t_{1/2}$ ).
- Concentrações em soro de trastuzumabe mínima e máxima

( $C_{min}$  e  $C_{max}$ ).

- Área sob a curva (AUC) para concentrações em plasma de docetaxel.

5 Medidas de Resultado de Eletrocardiograma: as medidas de resultado de ECG são as seguintes:

- QTcF corrigido em placebo ajustado por linha de base comparado no tempo.

- QTcB corrigido em placebo ajustado por linha de base comparado no tempo.

10 - Proporção de pacientes em cada ponto no tempo cujas gravações de ECG alcançam os seguintes critérios:

Nova incidência de prolongamento de intervalo QTc abasoluto (com base na correção de Fridericia) de  $> 450$  ms,  $> 470$  ms, e  $> 500$  ms.

15 As seguintes mudanças a partir da linha de base no intervalo QTc (com base na correção de Fridericia): Aumentos em QTc  $> 30$  ms, aumentos em QTc  $> 60$  ms.

Mudança a partir da linha de base na taxa cardíaca de  $\geq 25\%$ , resultante em uma taxa cardíaca final  $< 50$  batidas por minuto (bpm) ou  $> 120$  bpm.

20 Nova incidência de ondas U anormais

Nova incidência de ondas T anormais

Nova incidência de morfologia ECG anormal

25 - Diferenças corrigidas em placebo ajustadas pela linha de base comparadas no tempo nos seguintes parâmetros ECG: taxa cardíaca, intervalo QT, intervalo PR, e duração QRS.

#### Plano de Segurança

30 Mudanças de ECG clinicamente significativas detectadas durante esse subestudo serão relatadas e gerenciadas de acordo com as exigências de relatório e de monitoramento de segurança do Estudo TOC4129g/WO20698. O grau de prolongamento QTc será graduado de acordo com o NCI-CTCAE, Versão 3,0. O algoritmo de tratamento é fornecido para guiar as decisões do tratamento em estudo no evento de prolongamen-

to de QT/QTc durante esse estudo. Um laboratório central de ECG estará disponível para avaliar quaisquer casos de prolongamento de QT/QTc.

#### Grupo de Controle

5 Como o Estudo TOC4129g/WO20698 é um estudo controlado com placebo, randomizado e duplo-cego, o grupo de controle consistirá em pacientes randomizados para receber placebo ao invés de pertuzumabe.

#### Minimização de Indução

10 Para propósitos do estudo principal, os procedimentos abertos serão executados de acordo com o protocolo TOC4129g/WO20698. Para esse subestudo, o tratamento do paciente (pertuzumabe versus controle) será determinado pela análise de amostras de soro PK para a presença ou ausência de pertuzumabe, portanto, para manter o estudo principal cego, a equipe patrocinadora envolvida na análise de amostras PK de pertuzumabe e análise desse subestudo não será envolvida com quaisquer dos aspectos operacionais ou de análise do Estudo TOC4129g/WO20698. Toda equipe de estudo envolvida no estudo principal TOC4129g/WO20698 permanecerá cega (por exemplo, equipe do sítio, investigadores, pacientes, estatísticos, etc.).

20 OS leitores de ECG centralizados estarão cegos ao tratamento do paciente e ao ponto no tempo do ECG.

#### Pacientes

##### Seleção de Paciente

25 Os pacientes que consentiram em participar no Estudo TOC4129g/WO20698 em um subconjunto de sítios investigativos serão adequados para alistamento nesse subestudo.

Critérios para Inclusão: os pacientes precisam alcançar os seguintes critérios para serem adequados para a entrada no subestudo:

- Alistamento no Estudo TOC4129g/WO20698.
  - Formulário de Consentimento Informado Assinado para esse subestudo.
- 30

Critérios de Exclusão: os pacientes que alcançaram quaisquer dos seguintes critérios serão excluídos da entrada no subestudo:

- Marca-passo implantável ou desfibrilador cardioversor implantável automático (AICD).

- Síndrome Congênita de QT longo.

- Histórico familiar de síndrome de QT longo.

5 - QTc de linha de base > 450 ms como avaliado localmente em cada sítio de estudo.

- Pacientes atualmente exigindo uso regular de medicações que são conhecidas para prolongar intervalo QTc ou induzir TdP (vide Apêndice B).

10 - Bradicardia clinicamente significativa (definida como < 50 bpm) na linha de base.

- Evidência de bloco cardíaco.

- Hipocalcemia, hipomagnesemia, e hipocalcemia que não podem ser corrigidas com suplemento de eletrólito.

15 Método de tipo de Tratamento e mascaramento.

O tipo de tratamento será de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 1.

A abertura do tratamento de estudo estará de acordo com os procedimentos especificados no Exemplo 1. Os leitores de ECG centralizados permanecerão cegos ao tratamento de paciente e pontos no tempo do ECG.

#### Tratamento em Estudo

O tratamento em estudo será especificado no Exemplo 1.

#### Terapias Concomitantes e Excluídas

25 O julgamento clínico deveria ser aplicado quando determinando opções de tratamento e tratamento de cuidado assistente para cada paciente.

Outras medicações concomitantes e excluídas serão direcionadas no Exemplo 1.

30 Avaliações de Estudo

As infusões de tratamento em estudo, as medições de ECG, e retiradas de sangue deveriam ser consistentemente administradas, grava-

das, e coletadas na mesma hora do dia, entre 9 h – 12 h e > 1 hora pós-refeição, de modo a minimizar as variações devido a ritmos cicardianos.

#### Avaliações de Varredura e Pré-Tratamento

O consentimento informado precisa ser obtido antes das avaliações específicas de estudo serem executadas. O processo de consentimento informado deveria ser documentado no gráfico médico do paciente.

As seguintes avaliações de subestudo e procedimentos serão executados durante o período de linha de base do estudo descrito no Exemplo 1:

- 10                   - Consentimento informado escrito.
- Revisão de critérios de inclusão e exclusão.
- Química de soro para avaliar valores de eletrólito.
- Coleta de amostra de sangue para teste de alfa-1-glicoproteína ácida e análise por um laboratório local, como uma adoção ao teste de hematologia e química padrão no estudo descrito no Exemplo 1.

#### Medições de ECG

Os níveis de potássio, magnésio e cálcio em soro precisam estar dentro dos limites normais antes de executar ECGs, como determinado por teste de laboratório local executado como especificado no protocolo principal TOC4129g/WO20698. Os pacientes podem receber suplemento de eletrólito por prática padrão institucional para levar os níveis de eletrólito dentro de limites normais antes de executar os ECGs, re-testar os níveis de potássio, magnésio e cálcio deveriam ser executados de acordo com a prática padrão institucional.

25                   As leituras de ECG de 12 fios triplicadas serão obtidas durante o período de linha de base (Dia -7 a Dia -1, isto é, dentro dos 7 dias antes do Dia 1 do Ciclo 1) na mesma hora do dia no qual as medições de ECG serão executadas nos Ciclos 1 e 3.

30                   Para minimizar a variabilidade postural, é importante que os pacientes estejam descansando e em uma posição de costas por ao menos 10 minutos antes de cada coleta de ECG. As retiradas de sangue e outros procedimentos deveriam ser evitados durante o período imediatamente antes

da medição de ECG, e a atividade deveria ser controlada o máximo possível de modo a minimizar a variabilidade devido aos efeitos de estresse fisiológico. As refeições deveriam ser padronizadas o máximo possível entre pacientes, para evitar efeitos pós-refeições. Se possível, os ECGs deveriam ser coletados no mesmo tipo de máquina para cada sítio envolvido no estudo, e a mesma máquina deveria ser usada para todos os ECGs para um paciente específico. As instruções detalhadas em aquisições de ECG são fornecidas no manual do laboratório central de ECG.

Medições de ECG de 12 fios triplicadas precisam ser obtidas em cada ponto no tempo de avaliação, e deveriam ser coletadas por um período de 2 minutos (por exemplo, um único ECG a cada minuto).

#### Avaliações durante o Tratamento

Todas as visitas e avaliações durante o tratamento são executadas nos dias indicados. Para o protocolo descrito no Exemplo 1, um ciclo dura 21 dias.

Medições de ECG durante o Dia 1 do Ciclo 1, Dia 3 do Ciclo 1, e Dia 1 do Ciclo 3

ECGs de 12 fios (triplicadas) serão executados antes de coletar as amostras PK correspondentes. Todos os ECGs para um paciente deveriam ser obtidos na mesma máquina.

Níveis de potássio, magnésio e cálcio em soro precisam estar dentro dos limites normais antes de executar ECGs, como determinado por teste de laboratório local executado como especificado no protocolo principal TOC4129g/WO20698. Os pacientes podem receber suplemento de eletrólito por prática padrão institucional para levar os níveis de eletrólito dentro dos limites normais antes de executar ECGs, retestar os níveis de potássio, magnésio, e cálcio que deveriam ser executados de acordo com a prática padrão institucional.

Leituras de ECG de 12 fios triplicadas serão obtidas durante o Dia 1 do Ciclo 1 e Dia 1 do Ciclo 3 na mesma hora das medições de ECG de linha de base, nas horas seguintes do dia: 30 minutos e 15 minutos ( $\pm$  5 minutos) antes de infusão de pertuzumabe/placebo.

Quaisquer pré-medicações que são exigidas para infusões de pertuzumabe/placebo precisam ser dadas entre as duas medições de ECG pré-infusão.

- 5                   - 0 – 15 minutos pós-infusão de pertuzumabe/placebo  
                      - 60 – 75 minutos pós-infusão de pertuzumabe/placebo

Leituras de ECG de 12 fios triplicadas serão também obtidas durante o Dia 3 do Ciclo 1, pós-infusão de docetaxel e coincidente com amostra PK de 23 horas.

#### Amostras Sanguíneas Farmacocinéticas

- 10                   A menos que de outra forma especificado, amostras sanguíneas para avaliações PK deveriam ser retiradas nos seguintes pontos no tempo:

- Pré-dose: dentro de 15 minutos antes da infusão.
- Pós-dose: dentro de 15 minutos depois do fim da infusão.

- 15                   Aproximadamente 5 mL de sangue serão retirados em cada ponto no tempo PK.

#### Farmacocinéticas de Pertuzumabe

- 20                   As amostras de sangue para avaliação PK de pertuzumabe serão retiradas pré-infusão de pertuzumabe/placebo e pós-infusão de pertuzumabe/placebo nos seguintes ciclos: Ciclos 1, 3, 6, 9, 12, 15, e 18. Uma amostra adicional será retirada na Visita de Descontinuação de Tratamento (28 – 42 dias depois da última dose de tratamento em estudo).

- Nos ciclos 1 e 3, a amostra PK pós-pertuzumabe será retirada 60 – 75 minutos depois do fim da infusão de pertuzumabe/placebo (antes da administração de trastuzumabe).

- 25                   - Nos ciclos 1 e 3, as amostras PK pré-pertuzumabe e PK precisam ser coletadas depois dos ECGs correspondentes serem executados nesses pontos no tempo.

#### Farmacocinética de Trastuzumabe

- 30                   As amostras de sangue para avaliação PK de trastuzumabe serão retiradas pré-infusão e pós-infusão de trastuzumabe nos Ciclos 1 e 3.

No ciclo 3, a dose de trastuzumabe deveria ser retardada até depois das avaliações de ECG 60 – 75 minutos pós-pertuzumabe e da cole-

ta de amostra PK ter sido completada.

#### Farmacocinética de Docetaxel

As amostras de sangue para avaliação PK de docetaxel serão coletadas no Ciclo 1 nos pontos no tempo seguintes depois da iniciação da infusão de docetaxel (ponto no tempo 0):

5

##### - Dia 2 do Ciclo 1

0,5 hora (durante infusão)

1 hora (EOI)

1,25 horas (15 minutos depois de EOI)

10

2 horas (1 hora depois de EOI)

4 horas (3 horas depois de EOI)

6 horas (5 horas depois de EOI)

8 horas (7 horas depois de EOI)

##### - Dia 3 do Ciclo 1

15

24 horas (Ciclo 1: Dia 3, 23 horas depois de EOI)

#### Eventos Adversos

Os eventos adversos serão coletados e seguidos de acordo com as exigências do protocolo do estudo descrito no Exemplo 1.

#### Métodos de Ensaio

20

##### Ensaio Farmacocinético de Docetaxel

Amostras de plasma serão analisadas para concentrações de docetaxel usando um método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (ou equivalente), e as concentrações de plasma serão quantificadas comparando os resultados contra padrões conhecidos. O limite inferior de quantificação (LLOQ) para docetaxel em plasma humano será determinado de acordo com métodos de ensaio validados estabelecidos pelo laboratório contratado para executar as análises.

25

##### Ensaio Farmacocinético de Pertuzumabe

Amostras de soro serão ensaiadas para concentrações de pertuzumabe usando um ELISA que é atualmente sendo desenvolvido. A concentração mínima quantificável (MQC) para pertuzumabe em soro humano medido por esse ensaio é determinada.

30

### Ensaio Farmacocinético de Trastuzumabe

Amostras de soro coletadas na linha de base serão ensaiadas para concentrações de trastuzumabe usando um ELISA de ligação com receptor. Esse ensaio usa HER2-ECD de antígeno imobilizado para capturar trastuzumabe de amostras de soro. O MQC para trastuzumabe em soro humano medido por esse ensaio é 156 ng/mL.

As amostras de soro coletadas depois da administração de pertuzumabe serão ensaiadas para concentrações de trastuzumabe usando um ELISA que está atualmente sendo desenvolvido. O MQC para pertuzumabe em soro humano medida por esse ensaio é determinado.

### Descontinuação do Paciente

Os pacientes podem voluntariamente retirar ou ser descontinuados desse subestudo a qualquer hora. Os pacientes que são retirados desse estudo podem continuar a participação no Estudo TOC4129g/WO20698. As razões para descontinuação do paciente do subestudo incluem, mas não estão limitadas ao seguinte:

- Retirada voluntária do consentimento
- Não adesão
- Determinação do investigador que não é do interesse do paciente continuar (por exemplo, doença ou condição que exige o uso de fármacos proibidos ou tratamento proibido).
- Retirada do paciente do Protocolo TOC4129g/WO20698.

A razão primária para descontinuação cedo precisa ser gravada no formulário de relatório eletrônico apropriado (eCRF).

### Métodos Estatísticos

Devido ao pequeno tamanho da amostra, a ênfase de todas as análises será em estimativas. Nenhum teste de hipótese estatística formal é planejado.

### Análise do Comportamento do Estudo

O alistamento e descontinuação desse subestudo serão resumidos.

### Análise de Comparabilidade do Grupo de Tratamento

As características demográficas e de linha de base, tal como idade, sexo, e raça, serão resumidas usando médias, desvios padrão, faixas (para variáveis contínuas), e frequências e porcentagens (para variáveis ca-  
5 tegóricas). Os resumos serão apresentados pelo tratamento em estudo que os pacientes atualmente receberam.

### Análises Farmacocinéticas

A modelagem da população será usada para derivar estimativas de parâmetro PK post-hoc (CL, AUC,  $V_d$ , e  $t_{1/2}$ ) para pertuzumabe, e será  
10 resumida para o grupo de tratamento. Observados  $C_{max}$  e  $C_{min}$  para pertuzumabe e trastuzumabe serão resumidos para cada ponto no tempo de amostragem PK especificada. As estatísticas descritivas incluirão médias, faixas, e desvios padrão, como apropriado. Os parâmetros PK de pertuzumabe e dados de concentração-tempo de soro serão comparados com os  
15 dados disponíveis de outros estudos clínicos de pertuzumabe.

As amostras PK para docetaxel serão obtidas nos Dias 2 e 3 do Ciclo 1 somente. As concentrações de plasma e o AUC para docetaxel serão resumidas pelo braço de tratamento usando estatísticas descritivas como descrito acima. A relação de média geométrica para AUC entre os braços de  
20 controle e experimental será computada e os intervalos de confiança de 90% correspondentes serão fornecidos.

### Análises de Eletrocardiograma

A população de análise avaliada por ECG compreenderá todos os pacientes que recebem qualquer fármaco de estudo (como por Protocolo  
25 TOC4129g/WO20698) e que têm dados de ECG disponíveis para linha de base, o ponto no tempo pré-pertuzumabe/placebo no Dia 1 do Ciclo 1, e ao menos um ponto no tempo seguindo a administração de pertuzumabe/placebo no Ciclo 1 ou Ciclo 3. A média das leituras de ECG em triplicata para cada ponto no tempo será utilizada nas análises.

30 As estatísticas descritivas serão usadas para valor QTcF absoluto e mudança da linha de base em QTcF para cada ponto no tempo. A diferença no QTcF médio ajustado à linha de base entre os dois braços de tra-

tamento (ddQTcF) será fornecida bem como o intervalo de confiança de 90% de dois lados.

QTcB, HR, PR, e QRS comparados no tempo, ajustados à linha de base, e corrigidos por placebo serão resumidos em um modelo similar.

- 5 O número e a porcentagem de pacientes com gravações de ECG alcançando os critérios como descritos na Seção 3.2.2 serão tabulados para cada braço de tratamento e cada ponto no tempo pós-linha de base como apropriado.

#### Dados Perdidos

- 10 Nenhum dado de ECG perdido será inserido. Contanto que um dos ECGs triplicados é interpretado em cada ponto no tempo, um QTc será calculado. Se os pacientes não têm ECGs correspondentes em pontos no tempo de linha de base e pós-linha de base de interesse, eles não serão incluídos na análise para esse ponto no tempo.

#### 15 Determinação do Tamanho da Amostra

- Ao menos 50 pacientes avaliados por ECG foram alistados para esse subestudo. O tamanho da amostra para esse subestudo foi primariamente escolhido para fornecer uma estimativa de parâmetros PK e ECG chave. Nenhum teste de hipótese estatística é planejado. Assumindo uma taxa igual de participação entre os braços de tratamento (25 paciente por braço de tratamento) e um desvio padrão estimado de 20 ms, o intervalo de confiança de 90% de dois lados para a diferença ajustada à linha de base em QTcF entre os braços de tratamento (ddQTcF) estará dentro de 10 ms da diferença observada.

- 25 É esperado que ao menos 40 paciente alistados nesse subestudo serão avaliados PK. Um paciente avaliado PK é definido como um paciente que teve amostras PK completas coletadas no Ciclo 1 e no Ciclo 3. Com um tamanho de amostra de 40 pacientes avaliados e um coeficiente inter-paciente de variação em AUC de 30%, o intervalo de confiança de 90% para a relação da média geométrica das concentrações de docetaxel entre os braços de tratamento será (86%, 117%) se a média geométrica de AUCs observada para ambos os braços de tratamento são idênticos.
- 30

Um paciente avaliado por ECG é definido como um paciente que tem um ECG de linha de base interpretável bem como um ECG interpretável no Dia 1 do Ciclo 3 imediatamente pós-infusão de pertuzumabe/placebo (Cmax em regime permanente). Com esse tamanho de amostra de 40 pacientes adequados e um desvio padrão estimado de 20 ms, um intervalo de confiança de 95% para a diferença entre os braços de tratamento na mudança média em QTcF a partir da linha de base ao Ciclo 3 será  $\pm 12,4$  ms a partir da mudança média observada.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> GENENTECH, INC.  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO

<130> GNE-0318

<140> PCT/US2008/085416

<141> 03-12-2008

<150> 61/061,962

<151> 16-06-2008

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg Ile Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp



Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídio sintético"

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (65)..(65)

<223> Qualquer aminoácido

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr



Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídio sintético"

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 10

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídio sintético"

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly

<210> 11

<211> 217

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídio sintético"

<400> 11

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val  
 20 25 30

Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 65 70 75 80

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile  
 85 90 95

Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 13

<400> 13  
000

<210> 14

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln  
20 25 30

Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser  
35 40 45

Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile  
50 55 60

Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val  
65 70 75 80

Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp  
85 90 95

Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro  
100 105 110

Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys



Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr  
 1 5 10 15

Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser  
 20 25 30

Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr  
 35 40 45

Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu  
 50 55 60

Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp  
 65 70 75 80

Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His  
 85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu  
 100 105 110

Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His  
 115 120 125

His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu  
 130 135 140

Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu  
 145 150 155 160

Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala  
 165

<210> 17

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr  
 1 5 10 15

Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu  
 20 25 30

Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg  
 35 40 45

His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val  
 50 55 60

Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr



<212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <221> fonte  
 <223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 20  
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <221> fonte  
 <223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 21  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <221> fonte  
 <223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> /substituir="Leu"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> /substituir="Glu"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> /substituir="Ser"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(7)  
 <223> /observação = "Resíduo determinados na sequência não tem preferência em relação aos resíduos nas informações dadas pelas referidas posições"

<400> 22  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<223> /observação="Descrição da Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético"

<400> 23

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

1

5

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de câncer de mama, compreendendo administrar a um paciente com câncer de mama metastático HER2 positivo uma quantidade eficaz de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização de HER2, e um taxeno, em que o paciente não recebeu quimioterapia ou terapia biológica anterior.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento se liga a um epítopo dentro do Domínio IV (ID SEQ N<sup>o</sup> 17) da sequência de aminoácido de HER2.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento se liga a um epítopo 4D5 de HER2.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 se liga a HER2 na junção dos domínios I, II e III (ID SEQ N<sup>os</sup> 14, 15 e 16).

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o anticorpo inibidor de dimerização de HER2 se liga essencialmente ao epítopo 2C4.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo inibidor de crescimento e/ou anticorpo inibidor de dimerização de HER2 é um fragmento de anticorpo.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo inibidor de crescimento e/ou anticorpo inibidor de dimerização de HER2 é quimérico, humanizado ou humano.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo inibidor de crescimento é trastuzumabe, ou um fragmento desse, o anticorpo de dimerização de HER2 é pertuzumabe, ou um fragmento desse, e o taxeno é docetaxel.

9. Método para o tratamento de câncer de mama, compreendendo administrar a um paciente com câncer de mama metastático HER2 positivo uma quantidade eficaz de um primeiro anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítopo 2C4, um segundo anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno, em que o paciente não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o paciente é um paciente humano.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o primeiro e o segundo anticorpos são anticorpos monoclonais.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 10, em que ao menos um dos ditos primeiro e segundo anticorpos é um fragmento de anticorpo.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, em que ao menos um dos ditos primeiro e segundo anticorpos é quimérico, humanizado ou humano.

10 14. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o dito primeiro anticorpo é pertuzumabe.

15. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 14, em que o dito segundo anticorpo é trastuzumabe.

15 16. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o dito taxeno é docetaxel.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o dito taxeno é docetaxel.

20 18. Método de acordo com a reivindicação 10, em que os ditos primeiro e segundo anticorpos e o dito taxeno são administrados ao mesmo tempo.

19. Método de acordo com a reivindicação 10, em que os ditos primeiro e segundo anticorpos e o dito taxeno são administrados consecutivamente, em qualquer ordem.

25 20. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a administração do primeiro anticorpo precede a administração do segundo anticorpo e do taxeno.

21. Método de acordo com a reivindicação 16, em que ao menos um do pertuzumabe e do trastuzumabe é um anticorpo nu.

30 22. Método de acordo com a reivindicação 16, em que ao menos um do pertuzumabe e do trastuzumabe é um anticorpo intacto.

23. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a administração do pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel resulta em um efeito

cinérgico.

24. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a administração do pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel estende a sobrevida do paciente humano em relação ao tratamento na ausência de ao menos um de  
5 pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que a sobrevida livre de progressão (PFS) é estendida.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, em que a sobrevida global (OS) é estendida.

10 27. Método de acordo com a reivindicação 10, adicionalmente compreendendo a administração de um agente terapêutico adicional selecionado a partir do grupo que consiste em agente quimioterápico, um anticorpo contra HER diferente, anticorpo direcionado contra um antígeno associado a tumor, composto anti-hormonal, cardioprotetor, citocina, fármaco  
15 direcionado a EGFR, antiangiogênico, inibidor de tirosina quinase, inibidor COX, fármaco anti-inflamatório não esteroide, inibidor de farnesil transferase, anticorpo que se liga à proteína oncofetal CA 125, vacina contra HER2, terapia de direcionamento à HER, inibidor Raf ou ras, doxorubicina lipossômica, topotecana, taxeno, inibidor de tirosina quinase duplo, TLK286, EMD-  
20 7200, um medicamento que trata náusea, um medicamento que impede ou trata brotoejas na pele ou terapia padrão contra acne, um medicamento que trata ou impede diarreia, um medicamento de redução de temperatura do corpo, e um fator de crescimento hematopoiético.

28. Kit compreendendo um primeiro anticorpo contra HER2 se  
25 ligando essencialmente ao epítipo 2C4, um segundo anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítipo 4D5, e um taxeno, e uma bula ou rótulo com direções para tratar um paciente com câncer de mama metastático HER positivo, que não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica.

30 29. Método de promover pertuzumabe para o tratamento de um paciente com câncer de mama metastático HER2 positivo que não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com tras-

tuzumabe e um taxeno.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o taxeno é docetaxel.

5 31. Método de promover trastuzumabe para o tratamento de um paciente com câncer de mama metastático HER2 positivo que não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com pertuzumabe e um taxeno.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o taxeno é docetaxel.

10 33. Método de promover um taxeno para o tratamento de um paciente com câncer de mama metastático HER2 positivo que não recebeu anteriormente quimioterapia ou terapia biológica, em combinação com pertuzumabe e trastuzumabe.

15 34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o taxeno é docetaxel.

35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29-34, em que a promoção está na forma de um material escrito.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29-34, em que a promoção está na forma de uma bula.

**RESUMO**

Patente de Invenção: "TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO".

A presente invenção refere-se ao tratamento de câncer de mama metástico HER2 positivo anteriormente não tratado com uma combinação de um anticorpo contra HER2 inibidor de crescimento, um anticorpo inibidor de dimerização de HER2, e um taxeno. Em particular, a invenção considera o tratamento de câncer de mama metástico HER2 positivo em pacientes que não receberam anteriormente quimioterapia ou terapia biológica com um anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítopo 2C4, um anticorpo contra HER2 se ligando essencialmente ao epítopo 4D5, e um taxeno. A invenção adicionalmente compreende estender a sobrevida de tais pacientes pela terapia de combinação da presente invenção. Em uma modalidade preferencial, o tratamento envolve a administração de trastuzumabe, pertuzumabe e docetaxel.